

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

Biosensores electroquímicos para la detección de hormonas y sustancias dopantes

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Moreno Guzmán

Directores

**José Manuel Pingarrón Carrazón
Paloma Yáñez-Sedeño Orive
Araceli González Cortés**

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN DE HORMONAS Y SUSTANCIAS DOPANTES

Directores:

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

Catedrático de la UCM

Dra. Paloma Yáñez-Sedeño Orive

Catedrática de la UCM

Dra. Araceli González Cortés

Profesor Titular de la UCM

**TESIS DOCTORAL
MARÍA MORENO GUZMÁN
MADRID, 2012**



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

**DOÑA MARÍA ANTONIA PALACIOS CORVILLO, CATEDRÁTICA Y
DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID,**

HACE CONSTAR:

Qué el trabajo titulado **“Biosensores Electroquímicos para la detección de hormonas y sustancias dopantes”** ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores, **José Manuel Pingarrón Carrazón, Paloma Yañez-Sedeño Orive y Araceli González Cortés** Profesores de dicho departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 30 de Noviembre de 2012

Fdo. María Antonia Palacios Corvillo

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. Paloma Yañez-Sedeño Orive

Fdo. Araceli González Cortés

Fdo. María Moreno Guzmán



ÍNDICE

I

MWCNTs/OPPF6	53
4.7.1.4. Preparación del biosensor 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/ OPPF6.....	53
4.7.2. Preparación de los magnetoinmunosensores	54
4.7.2.1. Preparación del magnetoinmunosensor para prolactina.....	54
4.7.2.2. Preparación del magnetoinmunosensor para cortisol	55
4.7.3. Preparación de los inmunosensores basados en electrodos de superficie modificada con sales de diazonio	56
4.7.3.1. Preparación de los electrodos modificados con ácido aminofenilborónico	56
4.7.3.2. Preparación del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH- APBA/SPCE	56
4.7.3.3. Preparación del inmunosensor dual AP-Strept-Biotin-ACTH-anti- ACTH-APBA/SPCE y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE.....	57
4.7.4. Análisis de muestras	58
4.7.4.1. Determinación de androsterona en suero con el biosensor 3 α - HSD/MWCNTs /OPPF6/NAD+	58
4.7.4.2. Determinación de androsterona en suero con el biosensor 3 α - HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF6	58
4.7.4.3. Determinación de cortisol en suero y orina empleando un electrodo compuesto AuNPs/MWCNTs/OPPF6	58
4.7.4.4. Determinación de prolactina en suero con el magnetoinmunosensor AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs	59
4.7.4.5. Determinación de cortisol en suero con el magnetoinmunosensor AP-cortisol-anti-cortisol-Protian A-MBs	59
4.7.4.6. Determinación de ACTH en suero con el inmunosensor AP-Strept- Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE	60
4.7.4.7. Determinación simultánea de ACTH y cortisol en suero con el inmunosensor dual AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE y AP- cortisol/cortisol-anti-cortisol -APBA/SPCE	60

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1. Biosensores electroquímicos basados en electrodos compósitos de nanotubos de carbono y líquido iónico	63
5.1.1. Preparación y caracterización de los materiales compósitos	67
5.1.1.1. Estudios mediante espectroscopía de impedancia electroquímica	68
5.1.1.2 Estudios mediante voltamperometría cíclica	71
5.1.1.3. Influencia de la proporción MWCNTs/OPPF ₆	72
5.1.1.4. Comportamiento voltamperométrico de varios compuestos de interés sobre el electrodo MWCNTs/OPPF ₆	73
5.1.1.5. Estudio del material compósito AuNPs/MWCNTs/OPPF ₆	75
5.1.2. Biosensor para androsterona basado en un electrodo compósito de nanotubos de carbono, líquido iónico y NAD ⁺	79
5.1.2.1. Configuración del biosensor	83
5.1.2.2. Optimización de las variables experimentales	84
5.1.2.3. Calibrado y características analíticas	87
5.1.2.4. Parámetros cinéticos	90
5.1.2.5. Estudio de interferencias	91
5.1.2.6. Aplicación a la determinación de androsterona en suero humano	93
5.1.2.7. Conclusiones	94
5.1.3. Biosensor para androsterona basado en un electrodo compósito de tamaño micrométrico de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y líquido iónico	95
5.1.3.1. Configuración del biosensor	99
5.1.3.2. Optimización de las variables experimentales	100
5.1.3.3. Calibrado y características analíticas	102
5.1.3.4. Parámetros cinéticos	104
5.1.3.5. Aplicación a la determinación de androsterona en suero	

humano.....	105
5.1.3.6. Conclusiones	106
5.2. Inmunosensores electroquímicos basados en micropartículas magnéticas funcionalizadas.....	107
5.2.1. Inmunosensor electroquímico para prolactina basado en micropartículas funcionalizadas con estreptavidina y electrodos serigrafiados.....	111
5.2.1.1. Configuración del inmunosensor.....	115
5.2.1.2. Optimización de las variables experimentales	116
5.2.1.3. Calibrado y características analíticas.....	123
5.2.1.4. Estudios de reactividad cruzada	126
5.2.1.5. Aplicación a la determinación de prolactina en suero humano.....	128
5.2.1.6. Conclusiones	129
5.2.2. Inmunosensor electroquímico para cortisol basado en micropartículas funcionalizadas con proteína A	131
5.2.2.1. Configuración del inmunosensor.....	135
5.2.2.2. Optimización de las variables experimentales	136
5.2.2.3. Calibrado y características analíticas.....	143
5.2.2.4. Estudios de reactividad cruzada	145
5.2.2.5. Aplicación a la determinación de cortisol en suero humano.....	147
5.2.2.6. Conclusiones	150
5.2.3. Empleo de un electrodo compuesto nanoestructurado de tamaño micrométrico como detector para la determinación inmuno-electroquímica de cortisol	151
5.2.3.1. Fundamento del método.....	155
5.2.3.2. Optimización de las variables experimentales	155
5.2.3.3. Calibrado y características analíticas.....	160

5.2.3.4. Aplicación a la determinación de cortisol en orina y en suero humano.....	161
5.2.3.5. Conclusiones	162
5.3. Inmunosensores electroquímicos basados en electrdos de superficie modificada con sales de diazonio.....	163
5.3.1. Inmunosensor electroquímico para adrenocorticotropina basado en electrodos serigrafiados modificados modificados con ácido fenilborónico..	167
5.3.1.1. Configuración del inmunosensor.....	169
5.3.1.2. Caracterización de la superficie electródica.....	170
5.3.1.3. Optimización de las variables experimentales	172
5.3.1.4. Calibrado y características analíticas.....	179
5.3.1.5. Estudios de reactividad cruzada	182
5.3.1.6. Aplicación a la determinación de ACTH en suero humano	184
5.3.1.7. Conclusiones	185
5.3.2. Inmunosensor electroquímico basado en un elctrodo dual modificado con ácido fenilborónico para la determinación simultánea de adrenocorticotropina y cortisol	187
5.3.2.1. Configuración del inmunosensor.....	189
5.3.2.2. Caracterización de las superficies electródicas	190
5.3.2.3. Optimización de las variables experimentales	191
5.3.2.4. Calibrado y características analíticas.....	198
5.3.2.5. Estudios de reactividad cruzada	202
5.3.2.6. Aplicación a la determinación de ACTH y cortisol en suero humano.....	203
5.3.2.7. Conclusiones	204
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	205
7. BIBLIOGRAFÍA	209
8. PUBLICACIONES	217

9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	277
-----------------------------------	-----



1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la determinación de hormonas tiene un gran interés, ya que estas especies participan en muchos procesos bioquímicos importantes y están relacionadas con analitos a monitorizar en el campo de los biomarcadores de enfermedades. Sin embargo, los métodos usados en los laboratorios de análisis clínicos para su determinación se basan generalmente en la aplicación de técnicas de radioinmunoensayo, así como de metodologías tipo ELISA, que presentan algunos inconvenientes como son la falta de sensibilidad y de precisión de las medidas, el prolongado tiempo de análisis y el elevado consumo de reactivos. Por otro lado, también la determinación de estas especies interesa en el área de la Medicina Deportiva, debido a que algunas hormonas se administran en las prácticas ilegales de dopaje, por tratarse de sustancias capaces de mejorar el rendimiento físico o la resistencia al estrés, o de incrementar la masa muscular. En el control de estas prácticas se utilizan metodologías basadas mayoritariamente en el empleo de técnicas cromatográficas con detección mediante espectrometría de masas (GC/MS o LC/MS). Estas técnicas garantizan la plena identificación de las sustancias prohibidas presentes en muestras de orina o sangre, ya que detectan y cuantifican todos y cada uno de los analitos de interés. Sin embargo, adolecen de dos inconvenientes principales: a) presentar un coste de inversión y de mantenimiento instrumental muy elevados, y b) carecer de portabilidad, debiendo ser necesariamente utilizadas en los laboratorios analíticos de control. Unido a lo anterior, hay que tener en cuenta que en las grandes competiciones, la rapidez de los análisis es un objetivo prioritario, siendo necesario además maximizar la robustez de los métodos de cuantificación y confirmación. Cuando es posible, debe poderse analizar directamente la muestra, sin necesidad de preparación previa. Por todo ello, es necesario desarrollar métodos alternativos que permitan obtener resultados fiables y con un alto grado de exactitud, que aumenten la eficacia de las técnicas y metodologías existentes, satisfaciendo a la vez los requisitos indispensables de rapidez, exactitud y alta sensibilidad.

Con el fin de alcanzar estos objetivos, en esta Tesis Doctoral se propone el empleo de biosensores electroquímicos enzimáticos e inmunosensores para la detección de estas sustancias.



2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. Los objetivos planteados siguen los marcados en los Proyectos de Investigación financiados, mantenidos por dicho Grupo durante el tiempo de realización de los experimentos, en particular los de los Proyectos de referencia DPS08-07005-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y el Instituto de Salud Carlos III, CTQ2009-12650 del MICINN, y CTQ2012-35041 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). En ellos se expresaba el interés por el desarrollo de plataformas sensoras basadas en nanomateriales biocompatibles para la detección de sustancias dopantes, así como de nuevas estrategias de preparación de inmunosensores electroquímicos para su aplicación a la determinación de hormonas.

Siguiendo estos objetivos generales, se ha pretendido lograr la construcción de plataformas sensoras sensibles y selectivas para la determinación de estas especies, que permitieran desarrollar métodos analíticos competitivos con los procedimientos utilizados actualmente. Para lograrlo se ha hecho uso de diversas estrategias de modificación electródica empleando materiales de última generación, entre los que destacan los líquidos iónicos, las nanopartículas de oro, los nanotubos de carbono y las micropartículas magnéticas funcionalizadas. Además, se han aplicado alternativas de inmovilización de biomoléculas basadas en el atrapamiento o adsorción en materiales compósitos, y en reacciones de injertado de sales de diazonio y posterior unión con grupos de ácido borónico. En algunos casos, las configuraciones desarrolladas han supuesto la primera descripción de un inmunosensor electroquímico para la determinación de estas sustancias y en la mayoría de ellos, las características analíticas del método han aventajado a las alternativas existentes.

En cuanto al plan de trabajo, se ha seguido la metodología habitual en este tipo de investigaciones. Aunque las sistemáticas de preparación y optimización de los bioelectrodos son algo diferentes entre sí, sin embargo, existen aspectos comunes que han dirigido los experimentos. Estos aspectos pueden resumirse en las siguientes tareas:

- Estudios de optimización de las etapas implicadas en la preparación y funcionamiento del biosensor.
- Obtención de los calibrados y establecimiento de las características analíticas del método incluyendo los parámetros de reproducibilidad, estabilidad y selectividad.
- Aplicación al análisis de muestras reales de suero y/orina.



3. ANTECEDENTES

3.1. EMPLEO DE BIOSENSORES EN EL ANÁLISIS CLÍNICO

El principio de funcionamiento de un biosensor es la integración de un elemento de reconocimiento biológico y un transductor (Figura 1). La especificidad del primero y la sensibilidad del segundo confieren a estos dispositivos sus propiedades analíticas únicas. De ellas derivan algunos otros aspectos ventajosos, como es la rapidez de respuesta, la capacidad de miniaturización, la facilidad de uso y, sobre todo, la posibilidad de efectuar determinaciones directas en muestras complejas y a tiempo real. La reacción de reconocimiento molecular que tiene lugar en la primera parte del biosensor se traduce en la segunda en una señal habitualmente eléctrica u óptica, que se procesa electrónicamente, y que puede relacionarse con la concentración de la sustancia que se quiere determinar. Los dos componentes forman una unidad funcional cuya selectividad viene dada por la interacción del analito con el elemento biológico, y en la que la sensibilidad se consigue mediante un mecanismo de transducción adecuado.

Idealmente, el biosensor debe responder continua y reversiblemente a la especie de interés sin alterar la muestra, eliminando de este modo la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recogida [Pingarrón, 1999]. Los biosensores proporcionan, por un lado, una integración temporal, que permite realizar un proceso de medida química directa y así obtener una señal continua y reversible, y por otro, una integración espacial, lo que favorece la miniaturización.

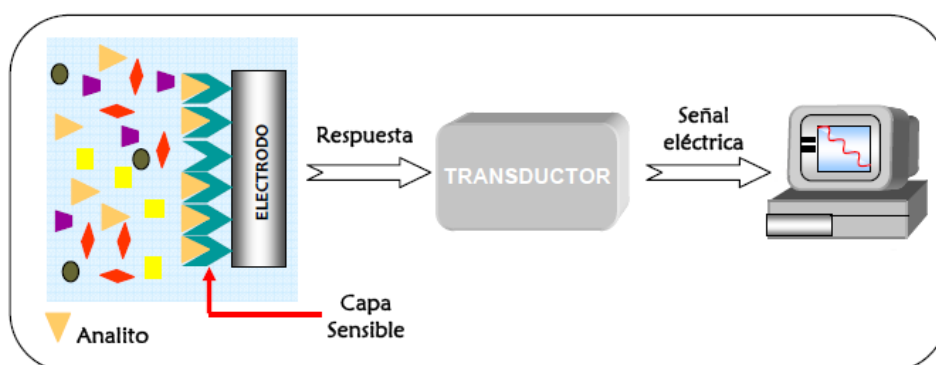


Figura 1.- Esquema de un biosensor.

La técnica instrumental en la que se basa el transductor se emplea como criterio para la clasificación de los biosensores. De entre ellos, los electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos o impedimétricos) y los ópticos (espectrofotométricos, fluorimétricos o basados en la medida de la resonancia de plasmón superficial, SPR), son los más comunes.

En los últimos años, las aplicaciones de los biosensores se han multiplicado en todas las áreas de interés analítico, destacando las relacionadas con la alimentación, el medio ambiente y la salud. Centrándonos en este último gran campo, el uso de biosensores afecta actualmente a todos los tipos de determinaciones que se realizan en las áreas farmacéutica y médica, tanto para el control de la producción como para el diagnóstico y el seguimiento rutinario de enfermedades. Desde el desarrollo, en los años sesenta, del primer biosensor de glucosa a partir de un electrodo de Clark [Clark, 1962; Updike, 1967], que supuso el comienzo de la demostración de la enorme utilidad tecnológica de esta herramienta analítica, la investigación en esta área ha crecido a un ritmo vertiginoso. Hoy en día, las características de los biosensores han hecho indispensable su uso en otras aplicaciones clínicas, en las que cada vez con mayor frecuencia se requiere monitorizar compuestos específicos, presentes casi siempre a bajas concentraciones. Algunos ejemplos son los neurotransmisores, los microorganismos o el colesterol, para los que se han descrito numerosas configuraciones y, más recientemente, los biomarcadores tumorales y de enfermedades cardiovasculares, de trastornos renales, hepáticos y de otros órganos. Un biomarcador es una característica bioquímica que se puede medir objetivamente y que se utiliza, fundamentalmente, para detectar una enfermedad (marcador diagnóstico), seguir su evolución (marcador pronóstico) o elegir un tratamiento (marcador predictivo) y monitorizarlo [Arthur, 2001]. Como se ha señalado en la Introducción, las hormonas, participantes en numerosos e importantes procesos fisiológicos, son algunas de las especies que se monitorizan en esta área particular, siendo además objetivo, en algunos casos, de los protocolos de detección de sustancias dopantes. Puesto que en este trabajo se han puesto a punto métodos para la determinación de cuatro tipos representativos de esta clase de biomoléculas, en

adelante se ilustrará con ayuda de ejemplos bibliográficos, el interés y la problemática del desarrollo de biosensores para su determinación.

3.1.1. Tipos de biosensores

Los biosensores electroquímicos son los más utilizados para la monitorización de especies de interés clínico. Esto es debido a sus importantes ventajas, entre las que destaca la naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas, que hace que sea posible analizar fácilmente volúmenes pequeños de muestra y su adaptación para la monitorización “in vivo”. Por otro lado, los límites de detección que se obtienen, normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} M, son apropiados para la determinación de numerosos analitos de interés en este tipo de muestras. Finalmente, la relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica y de su mantenimiento hacen posible el fácil acceso a estos dispositivos. Dentro de estos biosensores, los amperométricos, y los voltamperométricos basados en técnicas como la voltamperometría diferencial de impulsos y la de onda cuadrada, son los que cuentan con un mayor número de aplicaciones.

Aunque los biosensores electroquímicos enzimáticos son los más utilizados para la determinación de analitos como la glucosa, el colesterol o la creatinina, sin embargo, en el área de los biomarcadores y en el control del dopaje, la mayor parte de las configuraciones desarrolladas se basan en el empleo de biosensores de afinidad, principalmente inmunosensores. Esto es debido, por una parte, a las propiedades bioquímicas de las especies que es necesario monitorizar, que cuentan habitualmente con anticuerpos específicos y, por otra, a las características analíticas de este tipo de biosensores, destacando su selectividad, sensibilidad, y eficiente consumo de reactivos [Wang, 2008; Marquette, 2006]. Al mismo tiempo, los inmunosensores electroquímicos son dispositivos fáciles de utilizar, de automatizar, digitalizar y miniaturizar [Stefan, 2000; D’Orazio, 2003]. Estas características vienen a solventar las principales desventajas de las técnicas de inmunoensayo clásicas, principalmente el elevado consumo de tiempo, la escasa precisión de las medidas, y las dificultades que presentan para llevar a cabo su miniaturización. A pesar de sus propiedades, la transferencia de los diseños de inmunosensores desde los laboratorios de

investigación al mercado, es todavía escasa. Los obstáculos para su explotación se encuentran principalmente en las elevadas constantes de afinidad de las reacciones inmunoquímicas, que hacen que sea muy difícil lograr la regeneración óptima de las fases sensoras, y en el uso generalizado de marcadores para la generación de la señal analítica, lo que implica la adición de otros reactivos no integrados en la fase sensora [Velasco-García, 2003].

3.1.2. Biosensores electroquímicos para la detección de hormonas

La etapa crucial en la preparación de un biosensor electroquímico es la inmovilización del biomaterial sobre la superficie electródica. Por un lado, el procedimiento elegido debe proporcionar una buena estabilidad al recubrimiento, mientras que, por otro, el bioelectrodo debe mantener, en general, una elevada conductividad eléctrica. Los materiales electródicos empleados comúnmente para la fabricación de los biosensores son oro, carbono vitrificado y pasta de carbono. En cuanto a los métodos de inmovilización, los más utilizados se basan en la adsorción, el atrapamiento y el establecimiento de uniones covalentes o de afinidad.

Como se ha señalado, el empleo de inmunosensores electroquímicos es común en el área de los biomarcadores, empleándose esquemas de tipo competitivo o sándwich, bien conocidos. Para el diseño de estos dispositivos se siguen algunas metodologías de inmovilización especiales encaminadas fundamentalmente a lograr, además de las condiciones ya indicadas, una buena orientación de los inmunorreactivos sobre la superficie del electrodo [Tedeschi, 2003]. Con estos objetivos se han utilizado tanto métodos físicos, fundamentalmente por adsorción, como métodos químicos, ya sea mediante enlace covalente o uniones de afinidad. Hay que tener en cuenta que dentro de cada estrategia de inmovilización existen numerosas variantes, siendo posible utilizar, además, combinaciones de diferentes métodos.

Adsorción

La inmovilización de biomoléculas por adsorción es el método más sencillo. Consiste en poner en contacto el material biológico con el soporte electródico mediante incubación en una disolución o por deposición de una gota, durante un tiempo suficiente para que se produzcan interacciones de tipo no covalente entre los lugares activos del biomaterial y la superficie adsorbente. Estas interacciones pueden ser de diversos tipos: fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. Hay que señalar que este método puede presentar graves inconvenientes derivados de la aleatoriedad de la inmovilización con respecto a los grupos funcionales implicados en la biorreacción y del carácter reversible del proceso de adsorción, por lo que cambios de pH, fuerza iónica de la disolución o temperatura, pueden provocar la desorción de la biomolécula [Pingarrón, 1999]. Un ejemplo de la aplicación de esta metodología en el área de la detección de hormonas es la preparación de un inmunosensor electroquímico para estradiol, esteroide cuya determinación tiene interés en el tratamiento de la infertilidad y del estado postmenopáusico. El diseño propuesto estaba basado en la adsorción de IgG y anti-estradiol sobre un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE), seguido de un ensayo competitivo con estradiol y estradiol marcado con fosfatasa alcalina, alcanzando un límite de detección de 50 pg/mL mediante voltamperometría diferencial de impulsos [Pemberton, 2005]. Empleando otra configuración similar, se desarrolló un inmunosensor para las hormonas anabolizantes boldenona (4-androstadien-17 α -ol-3-ona) y metilboldenona (1,4-androstadien-17 α -metil-17 α -ol-3-ona) por adsorción del conjugado antígeno-BSA correspondiente sobre un SPCE seguido de competición entre al analito y el conjugado por el anticuerpo respectivo. Para la detección amperométrica se empleó un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, IgG-HRP, así como TMB (clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) como mediador redox. El límite de detección alcanzado en este caso fue de 30.9 ± 4.3 pg/mL (boldenona) y 120.2 ± 8.2 pg/mL (metilboldenona) [Lu, 2006].

En los últimos años se ha extendido el empleo de nanopartículas, principalmente metálicas y de óxidos, como modificadores electródicos capaces de mejorar las propiedades de adsorción. Muchas de las configuraciones descritas utilizan

nanopartículas de oro (AuNPs), que proporcionan un notable aumento de la superficie activa del electrodo en condiciones de inmovilizar el material biológico. Por ejemplo, esta fue la estrategia seguida en nuestro Grupo para la preparación de un inmunosensor para progesterona basado en la inmovilización del anticuerpo de captura sobre la superficie de un electrodo de AuNPs, grafito, teflón y tirosinasa. Se estableció un ensayo competitivo entre el antígeno y el antígeno marcado con fosfatasa alcalina (AP), empleando fenilfosfato como sustrato de la enzima. El fenol formado como producto de la reacción enzimática en presencia de AP se transforma en quinona a través de una reacción catalizada por la tirosinasa, midiéndose la respuesta electroquímica de reducción de esta especie a -0.1 V [Carralero; 2007]. En otra configuración, se desarrolló un inmunosensor para la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), utilizada para la detección del embarazo y de diversos problemas de salud, como la enfermedad trofoblástica gestacional. Se inmovilizó anti-hCG sobre una película de AuNPs y quitosan depositada sobre un electrodo de carbono vitrificado, estableciéndose un esquema de tipo sándwich con anti-hCG-HRP, que permitió obtener un intervalo lineal entre 0.20 a 100 mIU/mL de hCG, con un límite de detección de 0.1 mIU/mL. Debido al fuerte efecto electrocatalítico existente, fue posible aplicar un potencial de detección del peróxido de hidrógeno de -0.11 V sin necesidad de mediador [Yang, 2009].

Los nanotubos de carbono poseen propiedades muy favorables para la preparación de biosensores electroquímicos, destacando su alta conductividad, elevada área superficial y fuerte capacidad de adsorción. En sus aplicaciones se utilizan estrategias basadas en la modificación covalente o no covalente de este material, así como en la preparación de híbridos con polímeros u otros nanomateriales. Por ejemplo, para la determinación de testosterona, se construyó un inmunosensor basado en la deposición de anti-testosterona sobre un electrodo compuesto de AuNPs, nanotubos de carbono (MWCNTs) y teflón. El establecimiento de un ensayo competitivo entre la hormona y la testosterona marcada con peroxidasa (HRP) por las posiciones activas del anticuerpo, permitió detectar este compuesto en suero humano, con un límite de detección de 85.6 pg/mL [Serafín, 2011]. Como ejemplo de la utilización de nanotubos de carbono funcionalizados químicamente, puede citarse la

configuración descrita para la determinación de hCG basada en un electrodo serigrafiado con nanotubos de carbono (MWCNTs) y polisulfona combinado con la preparación de biomembranas por el método de inversión de fase para la incorporación de biorreactivos. La determinación de la hormona mediante inmunoensayo competitivo permitió alcanzar un límite de detección de 14.6 mIU/mL con un intervalo lineal de hasta 600 mIU/mL de hCG [Sánchez, 2008].

Recientemente han comenzado a desarrollarse inmunosensores basados en grafeno para aplicaciones clínicas. Como es conocido, el grafeno consiste en una única hoja de átomos de carbono unidos en una red hexagonal, y posee excepcionales propiedades electrónicas [Zhong, 2010; Du, 2010]. Como ejemplo de su utilización en este campo, puede citarse la preparación de un inmunosensor para noretisterona, una hormona esteroidea usada como anticonceptivo y promotor del crecimiento, empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con grafeno y tionina, seguido del tratamiento con glutaraldehído y la inmovilización del anticuerpo anti-noretisterona. El uso de un esquema de inmunoensayo tipo sándwich en el que la detección de la respuesta se realizaba mediante un conjugado de nanopartículas de sílice nanoporosa, nanopartículas de oro y HRP unido al anticuerpo secundario, permitió alcanzar un límite de detección de 3.58 pg/mL [Wei, 2010]. Una configuración similar fue utilizada por el mismo equipo para la determinación de hCG [Wei, 2011].

Para la construcción de este tipo de inmunosensores se han utilizado también otros sistemas más complejos basados en nanomateriales. Por ejemplo, recientemente se ha diseñado una configuración para la determinación de dietilestilbestrol (DES) en la que el anticuerpo de captura (anti-DES) se inmoviliza sobre un material nanocompuesto de sílice mesoporosa, nanopartículas de oro y nanotubos de carbono. Se empleó un esquema de tipo sándwich para la determinación de la hormona, utilizando como anticuerpo de detección anti-DES marcado con peroxidasa, nanopartículas de oro, azul de Prusia y nanotubos de carbono. En estas condiciones se obtuvo un calibrado recto entre 0.33 y 4500 µg/mL de DES mediante voltamperometría cíclica en presencia de hidroquinona como mediador [Liu, 2012SA].

Atrapamiento

Una estrategia de inmovilización aplicada mayoritariamente a la preparación de biosensores enzimáticos es la basada en el atrapamiento del biomaterial en el interior de una matriz polimérica, en la propia matriz transductora o por encapsulamiento dentro de una membrana semipermeable. El atrapamiento de enzimas durante el proceso de electrodeposición de polímeros conductores electrónicos ha proporcionado excelentes resultados en este campo [Ahuja, 2007]. Asimismo, puede decirse que la fabricación de biocompósitos por inclusión física de las enzimas en la pasta del electrodo constituye una estrategia sencilla, regenerable y rápida para la preparación de biosensores electroquímicos [Serra, 2002]. En estas aplicaciones, el empleo de electrodos de pasta fabricados con materiales como los nanotubos de carbono o las nanopartículas de oro, ha venido a mejorar las características analíticas de estas configuraciones, principalmente en lo que se refiere a la sensibilidad de la detección y a la estabilidad de las biomoléculas [Pingarrón, 2008; Agüí, 2008]. Un ejemplo, dentro del área dedicada a la detección de hormonas, es la configuración de un inmunosensor potenciométrico basado en el encapsulamiento de anti-testosterona en un sol-gel de poli(vinilbutiral) dopado con nanoalambres de oro dispuesto sobre un electrodo de platino. En presencia de testosterona, la reacción inmunoquímica que tiene lugar origina un cambio en la carga superficial que puede medirse como una diferencia de potencial [Liang, 2008]. Para fabricar estos diseños también se han empleado materiales de tipo sol-gel basados en silicatos modificados con compuestos orgánicos ("ormosil"). Por ejemplo, para la determinación de hCG se preparó una matriz por hidrólisis de tetraetiloxisilano y (3-aminopropil)triethoxisilano en la que se encapsuló el conjugado anti-hCG-HRP. Sobre este material, la peroxidasa mostraba transferencia electrónica directa a un potencial de -35 mV. En presencia del analito, hCG, la respuesta de la enzima disminuye linealmente a medida que aumenta la concentración de hormona en un intervalo de 0.5 a 50 mIU/mL [Tan, 2007].

Enlace covalente

La inmovilización química de biomoléculas ofrece algunas ventajas importantes frente a los métodos vistos anteriormente. Entre ellas cabe citar la mayor estabilidad y

reproducibilidad de la biocapa inmovilizada sobre el sustrato electródico, la posibilidad de conseguir un alto grado de recubrimiento uniforme, la reducción del número de posibles orientaciones aleatorias que puede adoptar la proteína en la superficie del electrodo, y el riesgo mínimo de pérdida de material biológico. Sin embargo, existe una desventaja, ya que cuando las biomoléculas se enlazan covalentemente en soportes sólidos, normalmente su capacidad específica de enlace disminuye. Las principales razones para esta reducción de actividad se deben a la orientación al azar de las biomoléculas y a la multiplicidad de posiciones de unión de la proteína con el soporte, lo cual impide el acceso al sitio activo, en el caso de las enzimas, o a la zona de reconocimiento antigénico, en el caso de los anticuerpos [Yuanyuan, 2006]. Por ejemplo, para la preparación de inmunosensores, se ha visto que la unión covalente de los anticuerpos al soporte empleando succinimida, carbodiimida, iodato o glutaraldehído, produce, en general, una pérdida de bioactividad debido a que los puntos de unión pueden situarse más o menos cerca de los parátomos, lo que hace que, en ocasiones, la orientación espacial del anticuerpo inmovilizado impida la formación del inmunocomplejo [Lu, 1996].

En relación al uso de esta alternativa, la fabricación de monocapas de autoensambladas tioles (SAMs) constituye una metodología muy adecuada para la inmovilización de anticuerpos o antígenos. Las configuraciones basadas en SAMs se caracterizan por presentar una menor adsorción inespecífica y permitir un mejor control de la orientación de los anticuerpos, lo que se consigue introduciendo ligandos complementarios a los sitios enlazantes de las proteínas. Un ejemplo ilustrativo es el diseño de un inmunosensor para progesterona basado en la inmovilización de anti-progesterona sobre un electrodo de oro modificado con nanopartículas de oro y una monocapa de cisteamina. La detección se realiza a través de un ensayo competitivo en presencia de progesterona marcada con peroxidasa y pirocatecol como mediador redox. El límite de detección fue de 0.08 ng/mL, con un intervalo lineal comprendido entre 0.08 y 7 ng/mL [Monerris, 2012]. Otros ejemplos de esta metodología se describirán en la parte dedicada al diseño de inmunosensores sin mediador.

La interacción de los ácidos borónicos con los 1,2- y 1,3-dioles puede aprovecharse para inmovilizar distintos tipos de glicoproteínas sobre superficies

electródicas modificadas adecuadamente. Una ventaja de esta estrategia es que la región glicosada se encuentra en áreas no involucradas en la actividad de estas biomoléculas [Abad, 2002]. En el caso de los anticuerpos, la interacción se produce en la región Fc, situada lejos de la zona de unión al antígeno, lo que permite una mayor eficiencia en la reacción antígeno-anticuerpo [Yoo, 2002; Ho, 2010] y una cierta orientación. Como desventaja, debe considerarse la relativa falta de estabilidad de las uniones debido a su carácter reversible. En la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún ejemplo de aplicación de esta alternativa a la detección de hormonas. Sin embargo, constituye una de las opciones exploradas en esta Tesis Doctoral, por lo que se comentarán en detalle sus características en el apartado correspondiente.

Unión por afinidad

El procedimiento de inmovilización mediante unión por afinidad supone también una excelente estrategia para lograr la óptima orientación de los anticuerpos. Dentro de este tipo de inmovilización se ha estudiado en gran detalle la interacción de estos con la proteína A. Esta proteína es un polipéptido de 42 kDa constituyente habitual de la pared del *Staphylococcus aureus*, que tiene cuatro lugares de unión potenciales a estas biomoléculas y es bifuncional, permitiendo así la formación de complejos multiméricos con las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada del anticuerpo. La unión implica la formación de un conjunto de enlaces no covalentes entre los aminoácidos de la región Fc y la proteína A. Estas interacciones, aunque de manera individual son débiles, en conjunto tienen una energía de unión que equivale o supera a un enlace de naturaleza covalente. Por otro lado, la unión de los anticuerpos a estos receptores Fc permite dejar libres los sitios de unión al antígeno, eliminándose así los inconvenientes de la orientación al azar de los anticuerpos sobre los soportes sólidos [Lu, 1996].

La proteína G posee una masa molecular entre 30 y 35 KDa. Se aísla de la pared celular del *Streptococcus beta-hemolítico* de las cepas G o C y también es capaz de unirse a la región Fc de los anticuerpos [Jung, 2007]. Las proteínas A y G se diferencian en su capacidad de reconocimiento de anticuerpos. La proteína G es capaz de

reconocer las cuatro clases de IgG incluyendo la IgG3, pero no tiene capacidad de unión para las IgM e IgA; además, tiene el inconveniente de que posee un segundo lugar de unión a la albúmina [Zatta, 1996]. Como ejemplo de su empleo en este campo, cabe citar la preparación de un inmunosensor para estradiol basado en un electrodo de oro modificado con propanotiol y una capa de cobre seguido de entrecruzamiento con dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato e inmovilización de proteína G. Una vez inmovilizado el anti-estradiol se estableció un ensayo competitivo con estradiol-BSA, utilizando voltamperometría de onda cuadrada (SWV) para monitorizar la variación de la corriente de reducción del ferrocenometanol. El límite de detección alcanzado fue de 12 pg/mL [Liu, 2012BB].

Finalmente, las estrategias de inmovilización de anticuerpos basadas en la unión específica avidina o estreptavidina-biotina presentan también algunas ventajas [Haussling, 1991]. La estreptavidina es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii*, mientras que la avidina es una proteína glicosilada (posee un 7% de carbohidratos) con carga positiva ($pI \sim 10.5$), aislada de la clara del huevo. La estreptavidina y la avidina son grandes proteínas tetraméricas (70 kD) que incorporan cuatro sitios de unión idénticos. La biotina es una molécula pequeña que se une a la posición de enlace de las biomoléculas con una constante de afinidad de 1×10^{15} . Este valor es casi el correspondiente al de la unión covalente, por lo que solo puede eliminarse en condiciones muy adversas, sin que afecten a esta interacción cambios de pH, temperaturas extremas, presencia de disolventes orgánicos o agentes desnaturizantes. Además, este tipo de inmovilización preserva con más efectividad la función biológica de las moléculas inmovilizadas que otras alternativas.

Magnetoinmunosensores

Desde hace algunos años se dispone de un material magnético en forma de micropartículas funcionalizadas con diversos grupos enlazantes capaces de interaccionar con las posiciones de unión de los anticuerpos. Por ejemplo, se han utilizado micropartículas magnéticas carboxiladas y tosiladas para inmovilización covalente, así como modificadas con estreptavidina, para su uso con moléculas biotiniladas, o con proteínas A o G, para la inmovilización por afinidad. La elevada

superficie activa de este material permite la inmovilización de una alta concentración de biomoléculas, lográndose diseños que poseen, en general, mejores límites de detección que las configuraciones convencionales equivalentes [Zacco, 2007]. Además, su uso facilita la aplicación práctica de las técnicas de inmunoensayo y la detección. En primer lugar, después de realizar cada etapa de conjugación sobre las micropartículas, estas se pueden separar con ayuda de un pequeño imán y proceder a la operación de lavado. Por otro lado, una vez preparado el inmunoconjugado completo, este puede atraparse del mismo modo sobre la superficie del electrodo. De esta forma se logra un efecto de preconcentración de inmunorreactivos en la superficie del transductor, lo que hace posible alcanzar una elevada sensibilidad y evitar los efectos matriz, así como medir volúmenes pequeños de muestra [Centi, 2007].

Como ejemplos de la aplicación de esta alternativa a la detección de hormonas, citar la preparación de un inmunosensor electroquímico para testosterona basado en micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A para la inmovilización de anti-testosterona y el establecimiento de un esquema de inmunoensayo competitivo con testosterona y testosterona marcada con peroxidasa (HRP). El inmunoconjugado resultante se inmovilizó sobre un electrodo serigrafiado de carbono detectándose la señal amperométrica del peróxido de hidrógeno a -0.2 V empleando hidroquinona como mediador. El límite de detección alcanzado fue de 1.7 pg/mL [Eguílaz, 2010]. Más recientemente, nuestro Grupo ha desarrollado un inmunosensor para la hormona del crecimiento (hGH) utilizando micropartículas magnéticas funcionalizadas con grupos tosilo sobre las que se inmoviliza anti-hGH. En este caso se estableció un esquema tipo sandwich empleando un anticuerpo anti-hGH secundario y anti-IgG marcado con fosfatasa alcalina. Con esta configuración es posible determinar la hormona en un intervalo lineal comprendido entre 0.01 y 100 ng/mL, con un límite de detección de 0.005 ng/mL.

Inmunosensores sin marcador

Como se ha visto, los inmunosensores descritos hasta ahora se basaban en el empleo de inmunoagentes marcados con enzimas como la peroxidasa (HRP) o la fosfatasa alcalina (AP). Estas enzimas catalizan procesos que proporcionan productos

electroactivos fácilmente detectables; además, poseen un alto poder catalítico, lo que origina una amplificación de la señal, permitiendo límites de detección más bajos [Kulys, 1980]. Sin embargo, existen otras alternativas que permiten prescindir de estos marcadores, con el fin de dotar a los dispositivos de ventajas generales, como la mayor simplicidad y rapidez de la detección, así como el menor coste de la configuración. En el campo del análisis clínico y, concretamente, para la monitorización de hormonas, se han desarrollado varios inmunosensores de este tipo. En ellos, la formación de complejos antígeno-anticuerpo se observa directamente aplicando técnicas capaces de detectar cambios en las propiedades del electrodo relacionadas con la reacción de afinidad [Ghindilis, 1998]. Con esta finalidad se han utilizado técnicas amperométricas y voltamperométricas y, más frecuentemente, medidas de impedancia electroquímica. La principal ventaja de estos sistemas directos es que los protocolos constan de una única etapa, por lo que el tiempo del ensayo es más breve. Por otro lado, las respuestas que se obtienen son función del cambio de masa de las especies inmovilizadas en la superficie, lo que dificulta su aplicación a moléculas de bajo peso molecular. Finalmente, la sensibilidad que se alcanza es generalmente menor que la obtenida con los métodos indirectos [López-Gil, 2002].

La medida de la disminución de la corriente debida a la obstrucción por la presencia de cantidades crecientes de biomolécula sobre el electrodo, se ha utilizado con éxito en algunas configuraciones. Por ejemplo, para la construcción de un inmunosensor para hCG, el anticuerpo anti-hCG se inmovilizó sobre una serie ordenada de nanotubos de Pt-Au, y la determinación del antígeno se realizó por medida amperométrica de la señal de reducción del peróxido de hidrógeno electrocatalizada por el nanomaterial, a -0.11 V. La relación lineal obtenida abarca entre 25 y 400 mIU/mL de la hormona [Tao, 2011]. En otro ejemplo se compararon las técnicas de voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) para la determinación de estradiol. Se empleó un electrodo de oro modificado con nanopartículas de oro/proteína G-N-succinimidil-6-[3'-(2-piridilditio)-propionamido] hexanoato (LC-SPDP), sobre el que se inmovilizó anti-estradiol, estableciéndose un ensayo competitivo entre el antígeno y el antígeno marcado con BSA. Los límites alcanzados fueron 26 y 18 pg/mL, respectivamente [Liu,

2010]. Para esta misma hormona se fabricó un inmunosensor basado en un electrodo de oro modificado con proteína G tiolada inmovilizada sobre nanopartículas de oro. Una vez incubado el conjunto en una disolución de anti-estradiol, se estableció, como en el ejemplo anterior, un ensayo competitivo utilizando BSA-estradiol, midiéndose los espectros de impedancias en presencia del sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. El intervalo dinámico se extendía en este caso hasta 1000 pg/mL, con un límite de detección de 26 pg/mL [Liu, 2009]. También se desarrolló un inmunosensor impedimétrico para la determinación de la hormona del crecimiento humano (hGH). El anticuerpo anti-hGH se inmovilizó sobre un electrodo de oro modificado con una monocapa de 1,6-hexanoditiol y nanopartículas de oro, encontrándose una relación lineal con la concentración de hGH entre 3 y 100 pg/mL [Rezai, 2009].

Como se ha visto en los ejemplos anteriores, la preparación de derivados tiolados y la modificación de la superficie electródica con monocapas de tioles son prácticas comunes para el desarrollo de inmunosensores de este tipo. En relación a esta metodología puede citarse también la construcción de un inmunosensor impedimétrico para insulina. Es bien conocido que esta hormona polipeptídica es secretada por las células pancreáticas, actuando como un regulador clave en la homeostasis de la glucosa. El diseño utilizado se basaba en el empleo de electrodos modificados con una monocapa de tiol derivado del etilenglicol (EG), concretamente $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-(\text{EG})_3-\text{OCH}_2-\text{COOH}$ en etanol, activada con EDC y NHS para unir covalentemente el anticuerpo anti-insulina. La medida de los espectros de impedancia con el sistema $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ proporcionó un límite de detección 1.2 pM [Xu, 2013]. Una configuración similar fue desarrollada para la determinación de estradiol empleando un electrodo de oro modificado con ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) activado, y en la unión covalente de receptor de estrógeno alfa [Im, 2010]. Posteriormente, estos mismos autores han descrito otra configuración de un inmunosensor impedimétrico para estradiol por inmovilización del receptor alfa y BSA sobre un electrodo de oro. El intervalo dinámico se extiende entre 10^{-13} y 10^{-9} M de estradiol [Kim, 2012].

3.2. CARACTERÍSTICAS Y MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS

A continuación se describen las propiedades de los analitos estudiados en este trabajo y se revisan los métodos que se han encontrado en la bibliografía para su determinación. Se han considerado los métodos basados en técnicas cromatográficas, así como los biosensores enzimáticos e inmunosensores desarrollados para estas especies y los procedimientos de inmunoensayo convencionales, incluyendo los “kits” comerciales.

3.2.1. ANDROSTERONA

Esta hormona, 3 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona, se produce de forma natural en el hombre y es un compuesto intermedio en la síntesis de andrógenos. Está relacionada con la testosterona (Figura 2), de la que es un metabolito producto de la reacción catalizada por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), aunque también puede formarse a partir de otros andrógenos suprarrenales, como la deshidroepiandrosterona (DHEA) [Saudan, 2004]. Fue descubierta por Butenandt en 1934, que también aisló la progesterona, recibiendo por ello el premio Nobel de Química en 1939. También en 1934, el químico suizo L.S. Ruzicka sintetizó la androsterona por vez primera. Se considera un esteroide neuroactivo ya que esta hormona es activa en el sistema nervioso central interaccionando con el ácido gamma-aminobutírico (GABA) [Dubrovsky, 2005]. Además, participa en la regulación de las características sexuales masculinas, encontrándose en una concentración relativamente elevada en la próstata. Se utiliza en medicina veterinaria para contrarrestar los efectos de la castración, así como para incrementar la masa muscular. Esta propiedad hace que se considere un esteroide anabólico androgénico, aunque de menor actividad que la testosterona. El consumo de androsterona por los practicantes de actividades como el culturismo está prohibida por el Comité Olímpico Internacional (IOC) desde los Juegos Olímpicos de Montreal (Canadá) celebrados en 1976. Entre los efectos secundarios que puede ocasionar el excesivo consumo de esta sustancia se encuentran trastornos hepáticos, cambios en la coagulación de la sangre y aumento de glóbulos rojos, así como impotencia sexual masculina.

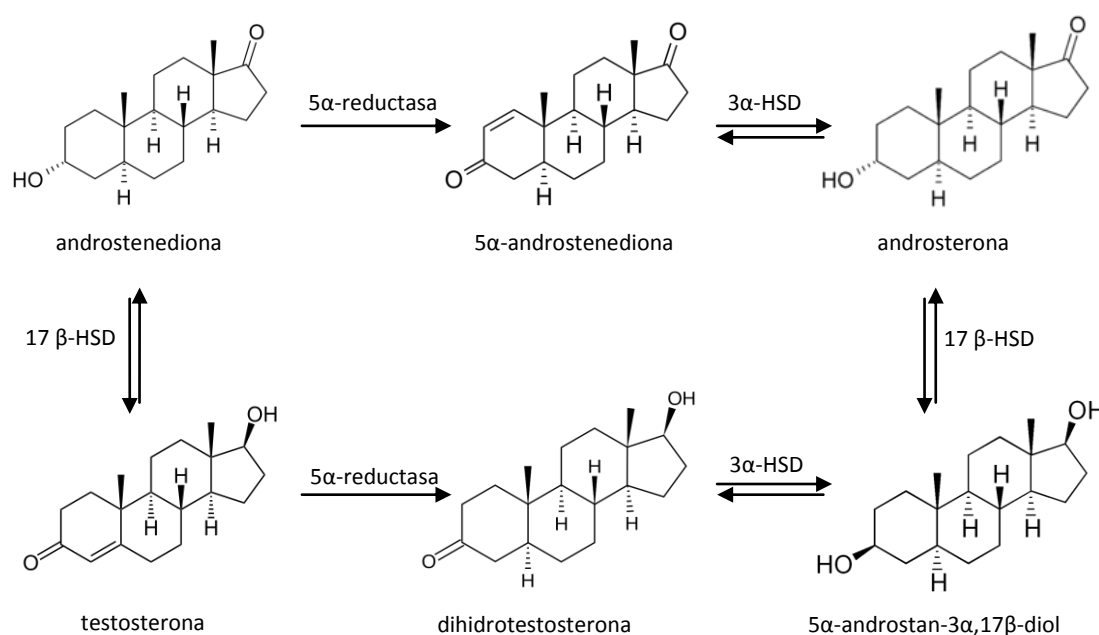


Figura 2.- Esquema de la formación de andrógenos [Stanczyk, 2003].

En el área del control del dopaje deportivo, la detección en muestras biológicas de este tipo de esteroides anabolizantes es uno de los principales retos [Gärtner, 2003]. En las últimas décadas se han desarrollado metodologías analíticas basadas en técnicas cromatográficas, principalmente GC/MS y LC/MS. Como ejemplos, citar los métodos de análisis de mezclas de androsterona y otras hormonas androgénicas y estrogénicas mediante el uso de cromatografía de gases – espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) [Trinh, 2011; Van Eenoo, 2011], o los análisis confirmatorios de esteroides en competiciones, a tiempo real, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas de relación isotópica (GC/IRMS) [Aguilera, 2009]. En cuanto a la determinación por cromatografía líquida, cabe citar la puesta a punto de un método para la determinación de androsterona en presencia de otros seis anabolizantes mediante microextracción en fase sólida (SPME) acoplada con LC-MS, en un intervalo de concentraciones de 0.5 a 20 ng/mL, con un límite de detección de 0.182 ng/mL [Ishizaki, 2010].

También se han descrito métodos de inmunoensayo tipo ELISA disponibles comercialmente en forma de “kit”. Se basan en el empleo de soportes recubiertos de anti-androsterona y el establecimiento de un esquema de inmunoensayo competitivo entre el antígeno y el antígeno marcado con biotina. La determinación se realiza en

presencia de avidina-HRP, añadiendo peróxido de hidrógeno y TMB como mediador redox. El calibrado se extiende entre 370.4 y 30.000 pg/mL de androsterona, siendo la concentración mínima detectable de 126.7 pg/mL. El tiempo de duración del ensayo es de 1h 50 min, aproximadamente [<http://www.uscnk.com>].

El desarrollo de biosensores enzimáticos basados en hidroxisteroide deshidrogenasas (HSDs) constituye una interesante estrategia de análisis para la detección selectiva de hidroxisteroides, como la androsterona, en muestras complejas. Estas enzimas catalizan específicamente las reacciones de oxidación o de reducción de los grupos hidroxilo- o ceto- de los esteroides que se encuentran en una posición determinada. La catálisis depende de la presencia de NAD(P)^+ en las reacciones de oxidación o NAD(P)H en las reacciones de reducción. En el caso de la androsterona, la enzima 3α -HSD actuará específicamente sobre el grupo hidroxilo en posición 3, dando lugar a la formación de androstenediona (ver Figura 2). A pesar de la especificidad de esta reacción, del menor coste y consumo de tiempo en relación a las técnicas de inmunoensayo, esta estrategia prácticamente no ha sido utilizada para la puesta a punto de biosensores enzimáticos. Únicamente se han encontrado dos configuraciones en la bibliografía consultada. Una de ellas se basa en la inmovilización de la enzima 3α -HSD en la superficie de un electrodo de carbono vitrificado por entrecruzamiento con glutaraldehído. Se obtuvo un calibrado lineal mediante amperometría a un potencial de 600 mV (vs SCE) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 25.8 y 164.7 μM [Teodorczyk, 1990]. Más recientemente se preparó un electrodo serigrafiado de Ir/C modificado con la misma enzima que se aplicó a la determinación de ácidos biliares producidos por la degradación del colesterol en el hígado [Bartling, 2009].

3.2.2. PROLACTINA

La prolactina (PRL) (Figura 3) es una hormona polipeptídica de masa molecular 23 kDa con una cadena de 199 aminoácidos y tres enlaces disulfuro, segregada por la parte anterior de la hipófisis, la adenohipófisis. Con sus más de cien efectos conocidos en el organismo, es una de las hormonas más versátiles en términos de acciones

biológicas, aunque las más conocidas son la estimulación de la lactancia, la regulación del crecimiento y la diferenciación de las glándulas mamarias [Sinha, 1995].

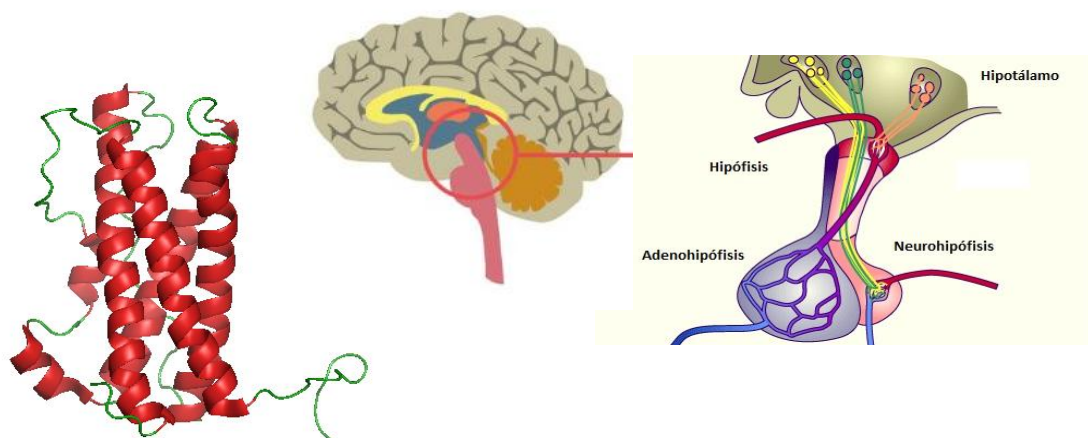


Figura 3.- Estructura de la prolactina y representación del sistema hipofisiario.

La Figura 4 muestra un esquema de los factores de regulación y acciones de la prolactina. Algunos medicamentos tranquilizantes, antidepresivos, drogas, opiáceos, la reserpina o la metildopa ejercen un efecto inhibitor sobre esta hormona. La dopamina inhibe la síntesis y la secreción de prolactina, mientras que el estrés y la hormona liberadora de la tirotropina (TRH), el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), la serotonina (5-HT) y los traumas torácicos, son factores estimulantes. Los estrógenos, principalmente el β -estradiol, son potentes estimuladores de la prolactina, disminuyendo además la eficiencia inhibitoria de la dopamina y aumentando la respuesta a la TRH. Por otro lado, el reflejo de succión en el pezón, mediado por el VIP, también estimula la producción de prolactina. En cuanto a sus acciones, la prolactina aumenta la secreción de leche, destacando entre sus efectos sobre las células de los alvéolos mamarios, un aumento de la síntesis de lactosa y una mayor producción de proteínas lácteas como la caseína y la lactoalbúmina. Por otra parte, dicha secreción solo tiene lugar después del parto, dado que la elevada presencia de estrógenos en la mujer embarazada tiene un efecto inhibitor.

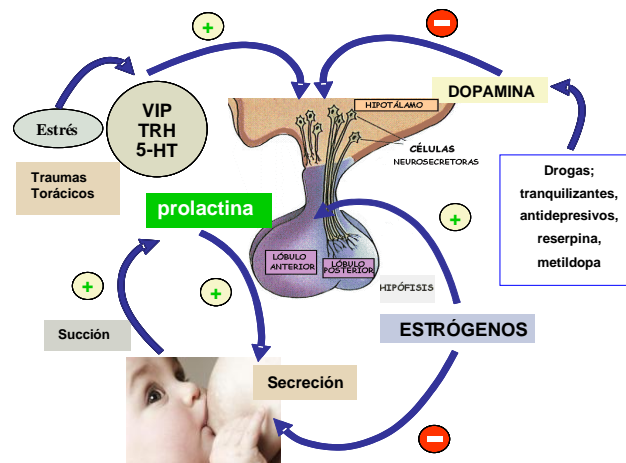


Figura 4.- Regulación y acciones de la prolactina.

Las concentraciones normales de prolactina en sangre se encuentran en el intervalo de 2 a 18 ng/mL en hombres y de 2 a 25 ng/mL en mujeres, variando de 10 a 209 ng/mL durante el embarazo. La determinación de esta hormona en suero es necesaria para el estudio de trastornos menstruales en las mujeres, galactorrea, hipogonadismo o infertilidad, entre otras enfermedades. Este parámetro también es útil para diagnosticar los desórdenes de la pituitaria hipotalámica. Los microadenomas (pequeños tumores pituitarios) pueden causar hiperprolactinemia. Cuando esta se confirma por medida de concentraciones superiores a 35 ng/mL en dos análisis repetidos, debe investigarse la posibilidad de un prolactinoma [Souter, 2010].

Se han descrito distintos tipos de inmunoensayos para la determinación de prolactina. Un ejemplo es el desarrollado para la determinación de la hormona en leche de rumiantes (*Bos frontalis*) basado en la inmovilización del anticuerpo sobre microplacas y el establecimiento de un ensayo competitivo con detección colorimétrica empleando prolactina biotinilada y estreptavidina marcada con peroxidasa [Mondal, 2007]. Una configuración similar fue utilizada por el mismo grupo para la cuantificación de prolactina en plasma de búfalo [Roy, 2007], y para la determinación de oxitocina y prolactina en plasma de yak [Sarkar, 2006]. Además, se han descrito otras configuraciones disponibles comercialmente en forma de “kits”. En la Tabla 1 se han resumido las características analíticas de algunos ejemplos representativos.

Tabla 1.- “Kits” de inmunoensayo comerciales para prolactina.

Marca	Inmunoensayo	Intervalo dinámico, ng/mL	LOD, ng/mL	RSD, %	t _{análisis} , min	Muestra	Volumen muestra, µL
Biovendor	ELISA sándwich	5 – 200	0.35	5.6-6.2	50	suero	10
Diagnóstica internacional	ELISA competitivo	5 - 200	2	-	65	suero	50
DIAsource	RIA ELISA sándwich	0.35 - 133	0.35	-	120	suero y plasma	25
Perkin Elmer	AlphaLISA, sándwich	0.125 - 300	0.125	-	90	suero	5
Calbiotech	ELISA sándwich	hasta 100	0.334	4.8-6.9	60	suero	25
Hölzel Diagnostika	ELISA sándwich	hasta 200	0.35	2.91-5.87	50	suero	25
GenWay	ELISA sándwich	hasta 200	2	-	80	suero	50
Anogen	ELISA sándwich	hasta 200	1.5	-	105	suero	50
Uscn Life Science Inc.	ELISA sándwich	4.7 – 75.8	1.5	-	75	suero, plasma y leche	50
Cusabio	ELISA sándwich	4.7 – 75.8	1.5	-	85	suero y plasma	50

Como puede observarse, la mayoría de los ensayos disponibles son de tipo ELISA en configuración sándwich. Se basan en el empleo de anti-prolactina y anti-prolactina marcada con peroxidasa, utilizando TMB para detectar colorimétricamente la formación del inmunocomplejo. El denominado “AlphaLISA”, de Perkin Elmer, es un ensayo inmunofluorimétrico basado en el empleo de partículas aceptoras y dadoras marcadas con anti-prolactina y anti-prolactina biotinilada, respectivamente. Sobre las primeras se hace incidir radiación de excitación por láser, produciéndose una emisión de radiación a 615 nm cuando tiene lugar la unión al antígeno.

En cuanto al empleo de inmunosensores, en la bibliografía consultada únicamente se ha encontrado una configuración. Se trata de un dispositivo multianalito para la determinación de folitropina, gonadotropina y prolactina en suero humano, basado en el empleo de un tubo capilar recubierto por los diferentes

anticuerpos. La determinación se realiza empleando un anticuerpo biotinilado y estreptavidina marcada con el reactivo fluorescente R-ficoeritrina [Petrou, 2002].

3.2.3. CORTISOL

Esta hormona, conocida indistintamente como cortisol o hidrocortisona es el glucocorticoesteroide de mayor importancia (Figura 5), cumpliendo un papel esencial en el mantenimiento de numerosas funciones del organismo. Al igual que otros compuestos de esta familia, se forma en la zona fasciculada de las glándulas suprarrenales a partir del colesterol. En la sangre, el cortisol se une mayoritariamente a la globulina fijadora de corticoesteroides (transcortina o CBG) y a la albúmina. Sólo una pequeña parte de la hormona circula de forma libre y puede interactuar con los receptores correspondientes [Aron, 1994]. Los efectos fisiológicos más importantes del cortisol son el aumento del nivel de glucemia por incremento de la gluconeogénesis y su acción antiinflamatoria e inmunosupresiva. El aumento de su concentración intracelular está relacionado con la diabetes tipo 2 y la obesidad.

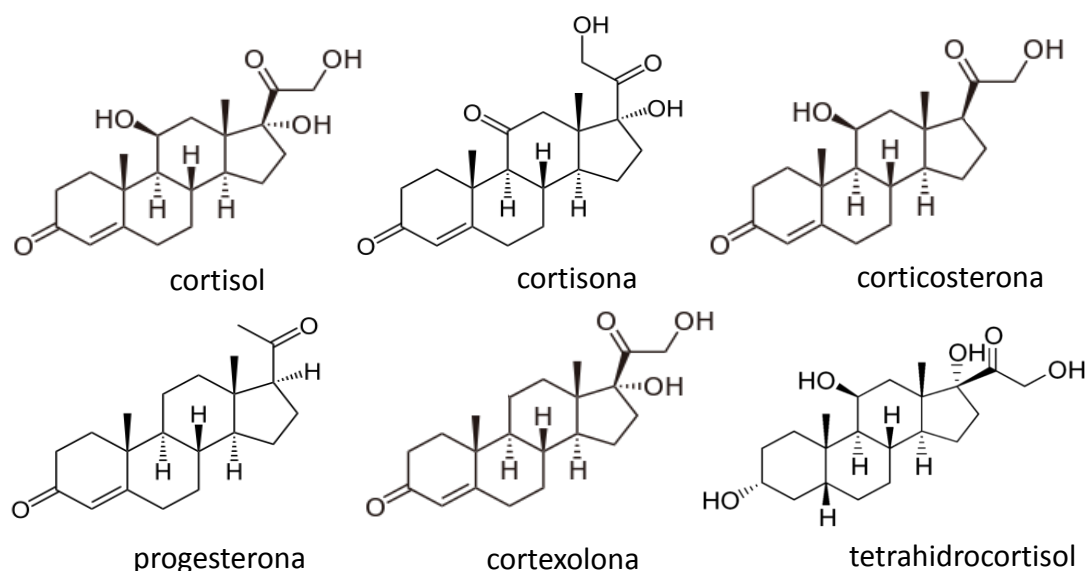


Figura 5.- Estructuras del cortisol y compuestos relacionados.

La síntesis y la secreción de cortisol por las glándulas suprarrenales están reguladas por un mecanismo de retroacción negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal (Figura 6). Frente a una concentración reducida de cortisol, el

hipotálamo secreta la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) que induce a la hipófisis a liberar adrenocorticotropina (ACTH). Esta estimula a la glándula suprarrenal a sintetizar y secretar cortisol. A su vez, el cortisol actúa sobre la hipófisis y el hipotálamo por retroacción negativa. La secreción de cortisol puede aumentar además a causa del estrés [Aron, 1994].

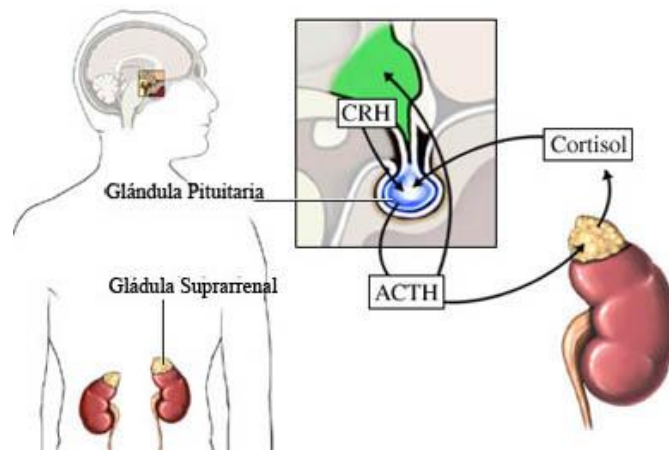


Figura 6.- Esquema del ciclo del cortisol.

Los niveles de cortisol en el organismo están relacionados con la función o disfunción de las glándulas suprarrenales, la hipófisis y el hipotálamo [Hasinski, 1998; Rosalki, 1998], y permiten detectar enfermedades como el síndrome de Cushing, caracterizado por una superproducción patológica de cortisol [Newell-Price, 1998; Ross, 1998] o la de Addison, debida a la subproducción de esta hormona. Por otra parte, el cortisol es un importante biomarcador del estrés, y su determinación es importante en medicina deportiva. Los glucocorticoides sintéticos se emplean en el deporte por sus propiedades antiinflamatorias, aunque su administración produce efectos secundarios, como ganancia de peso, retención de líquidos, infecciones, osteoporosis e incluso insuficiencia adrenal. En 1975, el Comité Olímpico Internacional restringió el uso de corticoides con fines terapéuticos. Actualmente está prohibido su uso por este organismo y por la WADA (World Anti-Doping Agency). Las concentraciones de cortisol en suero varían a lo largo del día. La concentración máxima, del orden de 700 nmol/L, se registra usualmente a primera hora de la mañana

y disminuye a lo largo del día, encontrándose al final de la jornada la mitad de concentración, aproximadamente.

Para la determinación de glucocorticoides se han puesto a punto métodos por GC/MS, si bien presentan el inconveniente de la labilidad térmica o la baja volatilidad de algunos de ellos. Además, la etapa de derivatización previa es difícil de optimizar, especialmente si se desea determinar una mezcla compleja de corticosteroides naturales y sintéticos. La metabolización que se produce en el cuerpo humano y las bajas concentraciones que se detectan en la orina suponen problemas analíticos añadidos. Los métodos empleados para muestras de orina humana requieren la aplicación de una etapa de separación mediante extracción en fase sólida (SPE), seguida de hidrólisis enzimática y purificación posterior [Pujos, 2005].

En relación a los métodos de inmunoensayo existentes, en la Tabla 2 se han resumido algunos de los más representativos, disponibles al igual que en otros casos en forma de “kits” comerciales. Como puede apreciarse, para esta hormona, debido a su pequeño tamaño molecular, destacan los métodos de inmunoensayo competitivo tipo ELISA, con detección colorimétrica, en los que el cortisol y el cortisol marcado con peroxidasa compiten por los lugares de unión del anticuerpo. El ensayo de Roche se basa en el empleo de analizadores marca Elecsys con detección electroquimio-luminiscente, destacando por su rapidez (18 minutos), mientras que el de IBL International, aplicable a muestras de saliva, hace uso de un reactivo luminiscente, con el inconveniente de requerir un elevado tiempo de análisis. Es interesante señalar el creciente interés hacia la aplicación de los métodos para la determinación de cortisol a las muestras de saliva. Esto es debido a que se trata de una muestra no invasiva, de la que los propios pacientes pueden recoger varias porciones a lo largo del día, lo que permite estudiar fácilmente las variaciones circadianas de su concentración [Anfossi, 2002].

Tabla 2.- “Kits” de inmunoensayo comerciales para cortisol.

Marca	Inmunoensayo	Intervalo dinámico, ng/mL	LOD, ng/mL	RSD, %	t _{análisis} , min	Muestra	Volumen muestra, µL
Biovendor	ELISA competitivo	5 – 600	4	5.6	90	suero	20
DIAsource	RIA	hasta 1000	0.9	5.2-15.1	45	suero, plasma	25
DIAsource	ELISA competitivo	5-600	4	2.9-9.4	85	suero	20
Calbiotech	ELISA competitivo	hasta 800	0.334	-	95	suero	25
Hölzel Diagnostika	ELISA competitivo	hasta 800	2.5	3.2-8.1	85	suero, plasma	20
Neogen	ELISA competitivo	hasta 10	-	-	90	plasma	50
GenWay	ELISA competitivo	hasta 500	8	<8	105	plasma, suero	20
Cusabio	ELISA competitivo	0.32 - 80	0.2	-	85	suero, plasma	50
ALPCO	ELISA competitivo	5 - 600	4	-	70	suero	20
Immulate, Siemens	ELISA competitivo	10 - 500	2	-	30	suero	10
DIAsource	ELISA competitivo	5 - 600	4	-	65	suero	100
Roche	ELISA competitivo	2.9 - 6300	0.36	3 - 4	18	suero, plasma, orina	20
Diagnostic Systems Laboratories	RIA test	5 - 600	3	-	45	suero, plasma, orina	-
IBL International	ELISA competitivo	0.08 – 40 3 – 2000	0.05 5	-	190	saliva, suero	20, 50
SALIMETRICS	ELISA competitivo	1.2 - 300	3	-	100	saliva	25

Finalmente, se han descrito varios inmunosensores basados en diferentes técnicas de detección para la determinación de bajas concentraciones de cortisol. En la Tabla 3 se resumen sus características analíticas. Como ejemplos, citar el desarrollo de inmunosensores colorimétricos aplicados al análisis de saliva basados en la formación del complejo antígeno-anticuerpo seguido de la adición de cortisol-poli-L-lisina. Tras varios lavados se consigue reemplazar el cortisol analito pero no el conjugado, debido al comportamiento de ligando polidentado poli-aminoácido. La adición posterior de

cortisol-HRP hace que este conjugado ocupe las posiciones iniciales del analito, lo que permite su determinación por medidas de absorbancia [Giraudi, 1999; Anfossi, 2002]. Nara y colaboradores desarrollaron un inmunoensayo competitivo basado en el empleo de haptenos. Se sintetizaron conjugados cortisol-3-O-carboxil-metiloxima-BSA como inmunógeno y corticosterona-3-carboximetiloxima unida a caproilhidrazida biotinilada y HRP para la detección [Nara, 2008]. La determinación de cortisol también puede llevarse a cabo mediante resonancia de plasmón superficial, SPR, por inmovilización covalente de anti-cortisol a una monocapa de ácido mercaptoundecanoico activada con EDC-NHS [Frasconi, 2009].

En cuanto a los inmunosensores electroquímicos, un primer ejemplo a destacar es el desarrollado por Kumar y colaboradores, basado en el empleo de la enzima 3 α -HSD, que cataliza la formación de cortisol a partir de cortisona, haciendo posible la determinación de ambas formas en un sistema miniaturizado, usando un electrodo de nanoalambres de oro recubiertos de anti-cortisol inmovilizado mediante uniones de afinidad avidina-biotina [Kumar, 2007]. También se desarrolló un inmunosensor amperométrico desechable para la determinación de cortisol basado en la inmovilización de peroxidasa y anti-cortisol sobre una membrana activada colocada en el extremo de un electrodo de oxígeno. La respuesta de corriente que se produce, debida a la reacción enzimática en presencia del sustrato, es inhibida por la unión del antígeno al anticuerpo inmovilizado [Xu, 1997].

Sun y colaboradores desarrollaron un inmunosensor electroquímico basado en el empleo de la enzima fosfatasa alcalina (AP) para la determinación de cortisol en saliva. En esta configuración se emplean microelectrodos de oro fabricados en el interior de un sistema microfluídico, que se funcionalizaron para inmovilizar el anticuerpo de captura. El producto generado en la reacción enzimática, *p*-nitrofenol, se detecta mediante voltamperometría cíclica [Sun, 2008]. También se ha descrito un inmunosensor electroquímico para la detección a tiempo real de corticosteroides basado en la competición entre el corticosteroide endógeno y el marcado con peroxidasa, por los sitios de unión al anticuerpo inmovilizado sobre un electrodo de platino. El electrodo está recubierto por una membrana de diálisis que lo separa del fluido de la muestra permitiendo la monitorización in vivo [Cook, 1997].

En otra configuración en la que cortisol y cortisol-HRP compiten por el anticuerpo, se procede a la separación mediante electroforesis capilar del cortisol-HRP y del complejo antígeno-anticuerpo, realizando la detección amperométrica del producto de la reacción enzimática sobre un haz de microdiscos de fibras de carbono [Jia, 2002].

Tabla 3.- Características analíticas de varios inmunosensores para la determinación de cortisol.

Técnica / Método	Características	Referencia
Formación inmunocomplejo; adición de cortisol-poli-L-lisina; desplazamiento de cortisol por cortisol-HRP. Competitivo y no competitivo colorimétrico.	LOD, pg/mL: 150 (no competitivo) 720 (competitivo)	[Giraudi, 1999]
Formación inmunocomplejo; adición de cortisol-poli-L-lisina; desplazamiento de cortisol por cortisol-HRP. Detección colorimétrica.	LOD, pg/mL: 72 (patrones); 509 (saliva)	[Anfossi, 2002]
Competitivo colorimétrico empleando conjugados cortisol-3-O-carboxil-metiloxima-BSA y corticosterona-3-carboximetiloxima unida a caproilhidrazida biotinilada y HRP para la detección.	LOD, 900 pg/mL; RSD, 3.3–7.8 % (intra-ensayo), 2.3–7.7 % (inter-ensayo); aplicado a suero	[Nara, 2008]
SPR/inmovilización covalente de anti-cortisol a una monocapa de ácido mercaptoundecanoico activada con EDC-NHS.	Intervalo lineal, 5–154 ng/mL; pendiente, 0.54 m°/μg L ⁻¹ (orina); 0.46 m°/μg L ⁻¹ (saliva); LOD, 2000 pg/mL; RSD, 8.9 (orina), 9.3 (saliva)	[Frasconi, 2009]
SWV / inmunosensor electroquímico basado en nanohilos de Au.	Intervalo lineal, (3.6–29) × 10 ³ ng/mL; pendiente, 0.66 nA/μM	[Kumar, 2007]
Amperometría / co-inmovilización HRP y anti-cortisol sobre electrodo de oxígeno.	Intervalo lineal (0.036–3.6) × 10 ³ ng/mL	[Xu, 1997]
CV / electrodo de Au microfabricado integrado en un sistema microfluídico.	Aplicado a muestras de saliva	[Sun, 2008]
Amperometría/ inmunosensor competitivo sobre electrodo de Pt; E _{apl} = 750 mV.	LOD, 2000 pg/mL; aplicado a sangre y orina	[Cook, 1997]
Amperometría/microdisco de fibra de carbono. Separación electroforética de HRP-cortisol y HRP-anti-cortisol.	Intervalo lineal, hasta 60 ng/mL; pendiente, 0.016 nC/μg L ⁻¹ ; LOD, 616 pg; RSD, 3.3%	[Jia, 2002]
SWV / electrodo Au modificado con AuNPs y Proteína G.	Intervalo lineal, 50-2500 ng/mL; pendiente, 1.6 μA /pg mL; LOD, 16 pg/mL	[Liu, 2011]

3.2.4. ADRENOCORTICOTROPINA (ACTH)

La adrenocorticotropina (ACTH) (Figura 7) es una hormona peptídica formada por 39 aminoácidos. Se sintetiza en la parte anterior de la hipófisis a partir de su precursor, la pro-opiomelanocortina (POMC), que se desdobra en los tejidos produciendo ACTH y una serie de péptidos relacionados [Cone, 2005; Talbot, 2003, Yalow, 1971]. La ACTH estimula la formación y secreción de glucocorticoides, especialmente de cortisol, por parte de las glándulas suprarrenales.

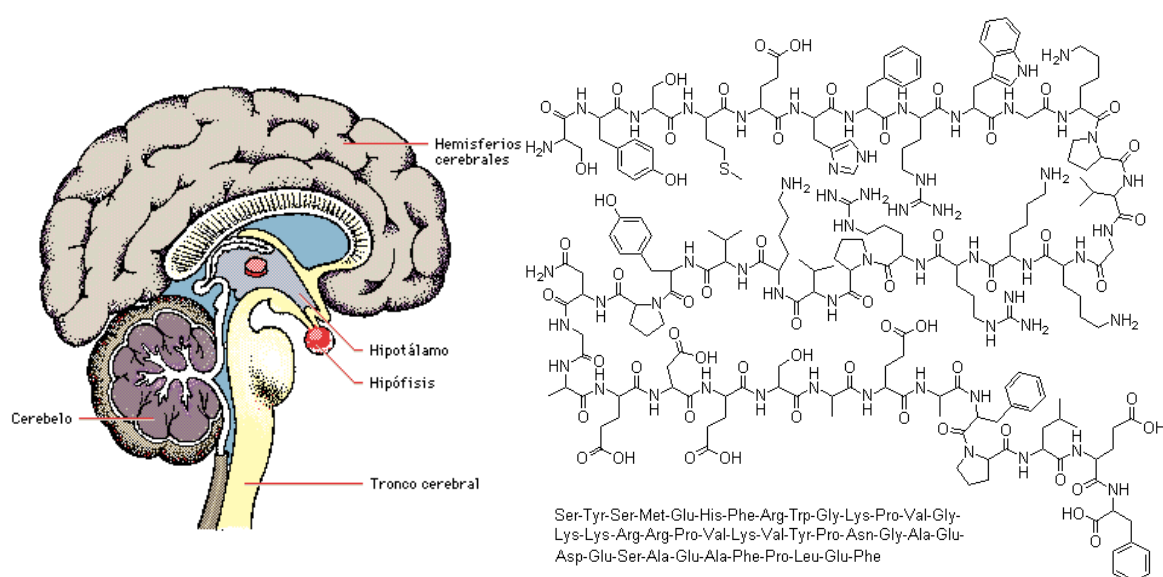


Figura 7.- Localización de la hipófisis y estructura química de la ACTH.

La producción de glucocorticoides está regulada por varios factores [Jacobson, 2005; Arlt, 2005; Lin, 2004; Engelmann, 2004]. Si el hipotálamo recibe estímulos debidos a los ciclos biológicos del organismo o a la actividad física, responde segregando la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Esta actúa sobre la hipófisis que reacciona sintetizando y secretando ACTH y, finalmente, la ACTH estimula a su vez a las glándulas suprarrenales que secretan entonces glucocorticoides. Tal como se ha representado en la Figura 8, la existencia en sangre de altas concentraciones de glucocorticoides inhibe por retroacción negativa la secreción de CRH y ACTH.

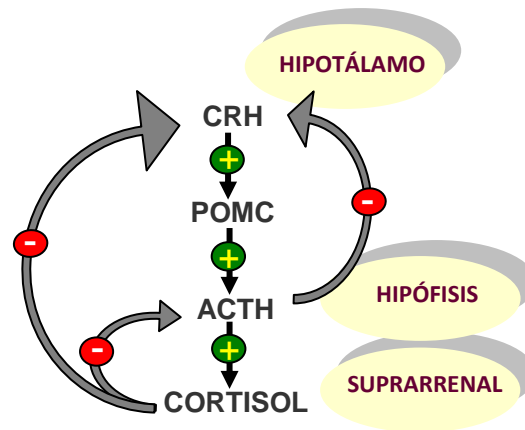


Figura 8.- Eje hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal y ciclos CRH-POMC-ACTH-cortisol.

Por otro lado, las concentraciones de ACTH están sujetas a un ritmo circadiano con altos niveles matutinos y bajas concentraciones vespertinas, que a su vez está relacionado con cambios paralelos en la concentración de cortisol [Norton, 2001]. Por esta razón, al igual que sucede con las muestras de cortisol, es indispensable indicar la hora de recolección de la muestra para poder interpretar correctamente los resultados de los análisis. Las determinaciones de ACTH en plasma contribuyen al diagnóstico diferencial de la enfermedad hipofisiaria de Cushing, ya citada en el apartado correspondiente al cortisol, y que cursa también con hipersecreción de ACTH. De aquí la importancia de la determinación conjunta de ambas hormonas. Además, pueden detectarse tumores hipofisarios secretores de ACTH (síndrome de Nelson), hipopituitarismo con deficiencia de ACTH, y el síndrome ectópico de ACTH [Beauregard, 2002; Lindsay, 2005; Talbot, 2003].

Como complemento a la determinación de cortisol, la de ACTH puede emplearse junto a pruebas funcionales o de estimulación para diagnosticar las causas de la superproducción de glucocorticoides. Análogamente, la determinación de ACTH puede facilitar el diagnóstico diferencial de la insuficiencia adrenocortical (enfermedad de Addison). La ACTH que no es sintetizada por la hipófisis se conoce como ACTH ectópica [Oliver, 2003] y su aparición se encuentra frecuentemente asociada al carcinoma pulmonar de células pequeñas. En casos aislados, la ACTH ectópica puede ser causada por tumores del timo, adenocarcinomas pancreáticos o carcinomas bronquiales, que segregan frecuentemente los precursores de ACTH (POMC y pro-

ACTH). Por último, desde el punto de vista del dopaje deportivo, la administración de ACTH externa está prohibida por la WADA, ya que estimula la producción de corticosteroides y genera sensación de euforia [Thevis, 2006]. Sin embargo, es bien conocida la existencia de adrenocorticotropina sintética comercial, de marca Synacthen, utilizada en el deporte para estimular la producción de cortisol.

Para la determinación de ACTH se han propuesto inmunoensayos, la mayoría de ellos automatizados, que emplean isótopos radiactivos (RIA) o detección quimioluminiscente, fluorimétrica y colorimétrica. Las características de algunos “kits” comerciales disponibles se han resumido en la Tabla 4. Como puede observarse, los intervalos de respuesta abarcan desde algunas unidades a varios cientos de ng/L de ACTH [Talbot, 2003; Brossaud, 2011; Vogeser, 2000; Dobson, 1987]. El inmunoensayo de los laboratorios Roche, con detección electroquímico-luminiscente (Elecsys), es similar al usado para el cortisol (ver Tabla 2). Se basa en un formato tipo sándwich que emplea dos anticuerpos monoclonales de la hormona, uno de captura biotinilado y uno de detección marcado con rutenio. Al igual que en ese caso, este inmunoensayo destaca por su rapidez. En otras configuraciones se utiliza un anticuerpo de captura biotinilado y otro de detección marcado con HRP, detectándose colorimétricamente la reacción de afinidad con ayuda del mediador TMB.

Además de los ya comentados, se han descrito otros métodos para la determinación de ACTH empleando diferentes técnicas. Como ejemplo, cabe citar el basado en la reacción del *p*-dimetilaminobenzaldehído con los restos triptófano de la hormona para formar una base de Schiff de color azul que se detecta espectrofotométricamente [Flynn, 1972]. Finalmente, la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) también se ha aplicado a la determinación de ACTH en plasma, obteniéndose un límite de detección de 100 fmol / mL [Thevis, 2006].

Tabla 4.- “Kits” de inmunoensayo comerciales para adrenocorticotropina.

Marca	Inmunoensayo	Intervalo dinámico, pg/mL	LOD, pg/mL	RSD, %	t _{análisis}	Muestra	Volumen muestra, μL
Roche	sándwich electroquímio- luminiscencia	1.0 - 2000	1	-	18 min	plasma	50
Diagnostic Systems Laboratories	IRMA	7.6 - 2000	1.3	-	18 - 22 h	plasma	-
DIAsource	IRMA	9.6 - 1932	1.16	-	3 h	plasma	200
mdbioproducts	ELISA sándwich	hasta 500	0.46	3.1 - 6.2	40 min	plasma	200
ShangHaiBlueGen eBiotech	ELISA sándwich	hasta 1000	1	-	1h 30 min	suero, plasma	50
Hölzel Diagnostika	ELISA sándwich	hasta 165	0.22	2.3 - 7.1	4h 30 min	plasma	200
GenWay	ELISA sándwich	hasta 500	-	-	4h 30 min	plasma	200
Phoenix pharmaceuticals	ELISA competitivo	40-25000	-	-	4h 30 min	plasma	50
Uscn	ELISA competitivo	12.3 - 1000	3.2	-	1h 50 min	suero, plasma	50
Abnova	ELISA sándwich	hasta 255	1	3.1 - 6.2	5 h	plasma	200



4. PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTACIÓN

4.1.1. APARATOS

Las medidas voltamperométricas se realizaron en un potenciostato Autolab PGSTAT12 equipado con un software GPES 4.7 (General Purpose Electrochemical System) (Figura 9).



Figura 9.- Potenciostato utilizado para las medidas voltamperométricas.

Para las medidas amperométricas se empleó un detector amperométrico de InBea Biosensores S. L. (Figura 10).



Figura 10.- Potenciostato utilizado para las medidas amperométricas.

También se utilizó un potenciostato μ Autolab tipo III, controlado por el software FRA2 (Ecochemie) para las medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) (Figura 11).

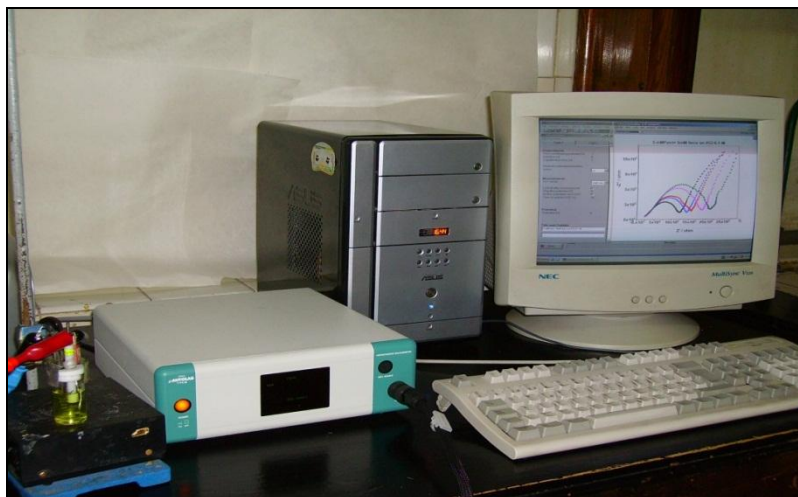


Figura 11.- Equipo utilizado para las medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica.

Para realizar las medidas electroquímicas con los electrodos duales, se utilizó un potenciostato CH instruments 1030B de ocho canales (Figura 12).

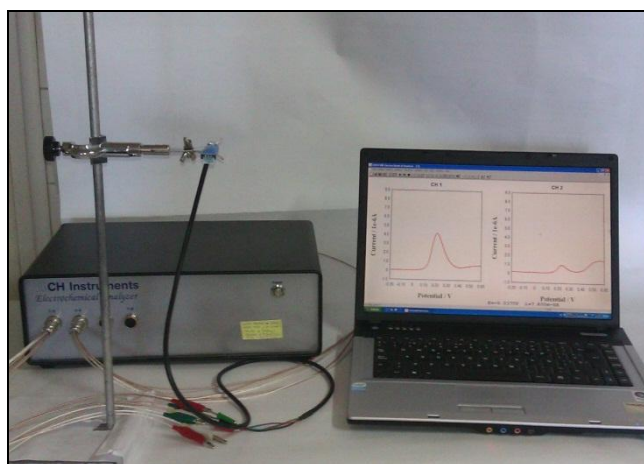


Figura 12.- Potenciostato utilizado para las medidas por DPV.

Otros aparatos utilizados han sido:

- pH-metro de precisión Metrohm Herisau E-510, calibrado de la forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.0, 7.0 y 9.0 a 25.0 ± 0.5 °C.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- Incubador Optic Ivymen System provisto de agitación y sistema de control de temperatura (Comecta S.A.)
- Agitador Vortex (Heidolph).
- Agitador magnético P-Selecta Agimatic

4.2. ELECTRODOS Y CÉLULAS ELECTROQUÍMICAS

Electrodos

Se utilizaron electrodos compósitos de tamaño convencional (Figura 13) y micrométrico (ver Figura 17) basados en pastas de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y un líquido iónico (IL). Estos electrodos se prepararon en el laboratorio siguiendo los procedimientos experimentales descritos en los Apdos. 4.7.1.1. y 4.7.1.3.

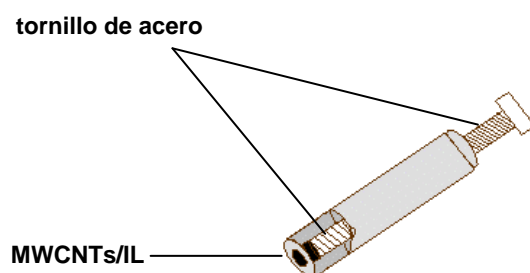


Figura 13.- Esquema del electrodo compuesto de tamaño convencional.

También se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) ($A = 12.56 \text{ mm}^2$) marca DropSens (Oviedo, España) (Figura 14), y electrodos duales serigrafiados de carbono de la misma marca, con dos electrodos de carbono de forma elíptica, cuya

área es de 5.6 mm^2 (Figura 15). Ambas configuraciones incluyen un electrodo de pseudorreferencia de plata y un electrodo auxiliar de carbono.



Figura 14.- Electrodo serigrafiado de carbono (SPCEs).

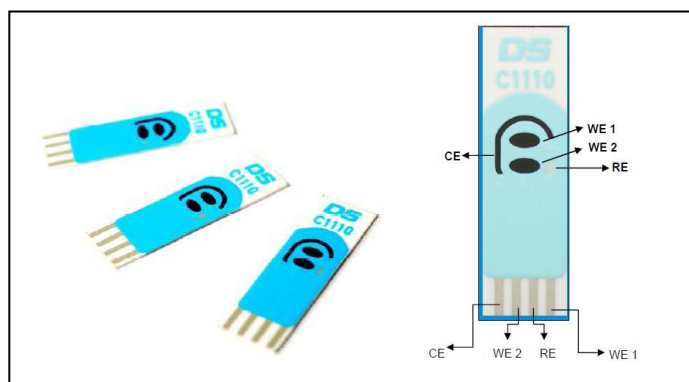


Figura 15.- Electrodo serigrafiado dual de carbono (dual SPCEs).

Células electroquímicas

Para las medidas con los electrodos compósitos de tamaño convencional se empleó la célula electroquímica de 10 mL que se muestra en la Figura 16, con un electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M modelo BAS MF 2063 y un electrodo auxiliar de alambre de platino.

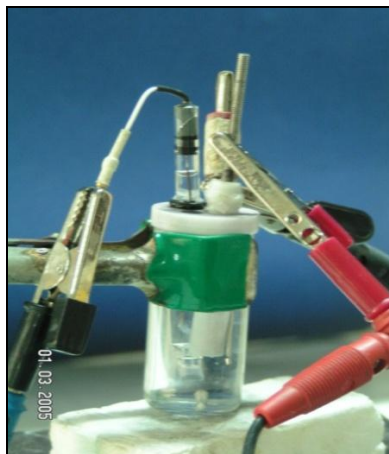


Figura 16.- Célula electroquímica empleada para las medidas con electrodos compósitos de tamaño convencional.

Las medidas con el electrodo compósito de tamaño micrométrico se realizaron en una célula de vidrio de 500 μL (Figura 17), empleando un electrodo Ag/AgCl/KCl 3M (ϕ 2 mm) fabricado en el laboratorio, y un electrodo auxiliar de alambre de platino.

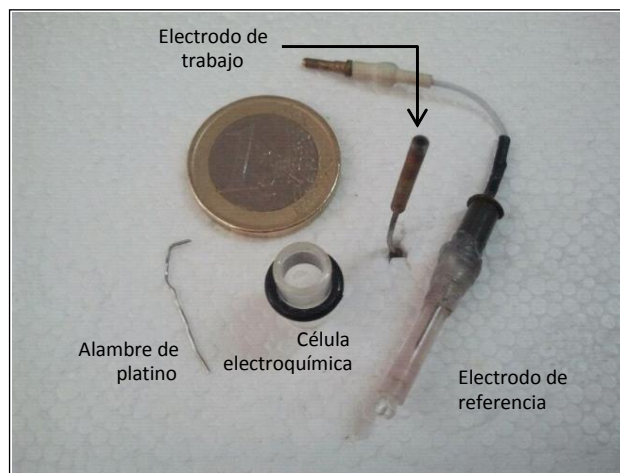


Figura 17.- Electrodo compósito de tamaño micrométrico y célula electroquímica empleada para las medidas.

4.3. OTROS MATERIALES

- Imán de neodimio (AIMAN GZ)
- Separador magnético (DynaL MPC-S (product no. 120.20, Dynal Biotech ASA) (Figura 18).

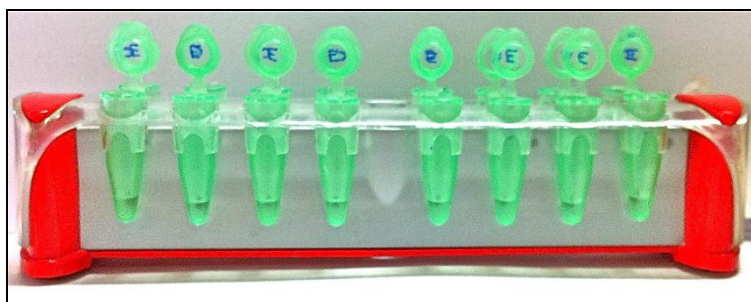


Figura 18.- Separador magnético.

4.4. REACTIVOS

Hormonas y sustancias dopantes

Para su empleo como analitos y como especies potencialmente interferentes en los métodos desarrollados, se utilizaron los productos siguientes, todos ellos de la marca comercial Sigma y pureza superior al 98%: cortisol, cortisona, cortexolona, tetrahydrocortisol, corticosterona, progesterona, testosterona, hormona del crecimiento humana (hGH), estriol, melatonina, testosterona, 17 β -estradiol, 19-nortestosterona (nandrolona). También se emplearon: androsterona (3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one, Fluka), adrenocorticotropina (ACTH, GenWay Biotech), adrenocorticotropina biotinilada (ACTH-Biotin, AnaSpec), prolactina humana recombinante purificada (PRL, Immunometrics), cortisol-3-fosfatasa alcalina con actividad enzimática de 1840 U/ mg (AP-cortisol, Cal Bioreagents) y estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (AP-Strept, Sigma). La Figura 19 muestra las fórmulas estructurales de algunos de estos compuestos. Las estructuras no representadas aparecen en distintos apartados a lo largo de la Memoria.

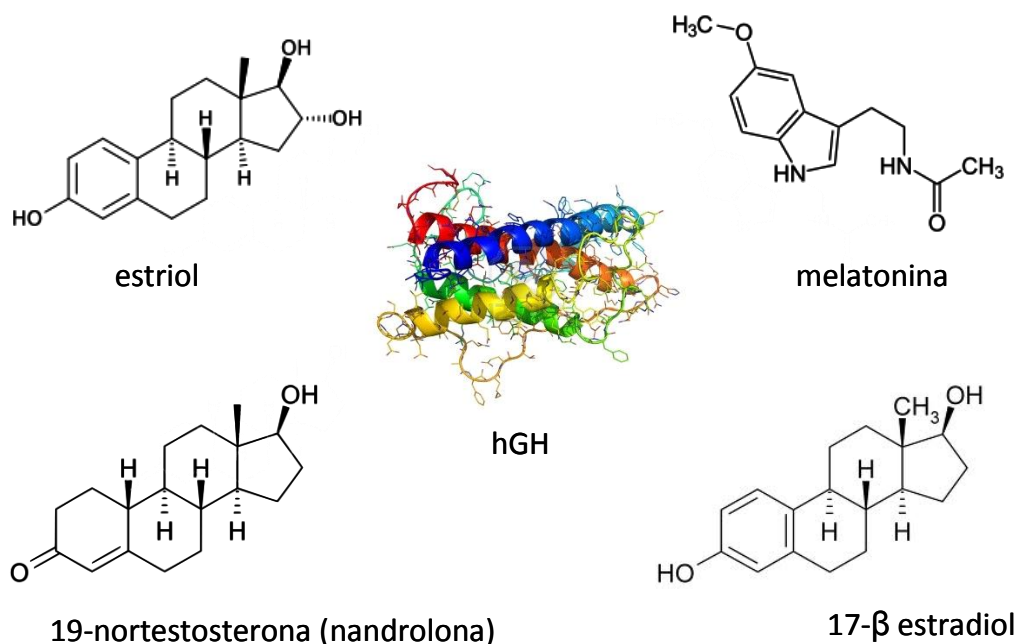


Figura 19.- Estructuras de algunas hormonas.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para la preparación de los inmunosensores fueron: anti-cortisol monoclonal de roedor (anti-cortisol, East Coast Bio), anti-prolactina biotinilado monoclonal de ratón (anti-PRL-Biotin, Hytest), anti-prolactina monoclonal de ratón marcado con fosfatasa alcalina (AP-anti-PRL, Immunometrics), y anti-adrenocorticotropina C-terminal (anti-ACTH, Fitzgerald).

Enzimas

Para la preparación de los biosensores de androsterona se utilizó la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD) de *Pseudomonas testosteroni* H1506 (Sigma).

Otros reactivos

Para la preparación de los materiales electrónicos se emplearon: nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, ϕ 30 \pm 15 nm, Nanolab, 95%), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIMPF₆, Fluka, >98.5%), hexafluorofosfato de

octadecilpiridinio (OPPF₆, Io-Li-Tec), poli(tetrafluoretileno) (teflón, Aldrich), ácido tetracloroaúrico (Sigma, 99%) y citrato sódico (Sigma, 99%).

Los reactivos utilizados para la modificación de los electrodos con sales de diazonio fueron: ácido 4-aminobenzoico (ABA, Acros), ácido 3-aminofenilborónico (APBA, Sigma), clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC, Sigma), N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma), y nitrito sódico (Panreac).

Se emplearon partículas magnéticas funcionalizadas con Proteína A (Protein A-MBs, Dinabeads[®] Proteína A, Invitrogen Dynal, 30 mg/mL) y con estreptavidina (Strept-MBs, Dinabeads[®] estreptavidina, Invitrogen Dynal, 10 mg/mL) para la preparación de los magnetoinmunosensores.

Las disoluciones reguladoras de pH se prepararon a partir de NaH₂PO₄ (Scharlau, 99%), Na₂HPO₄ (Scharlau, 99%), MgCl₂ (Panreac, 99%), Trizma[®] (tris(hidroximetil)-aminometano, Sigma, 99%), Tween[®] 20 (Aldrich), Tris-HCl (clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano, Scharlau, 99%), NaCl (Scharlau, 99%) y KCl (Scharlau, 99%).

Otros reactivos utilizados fueron: peróxido de hidrógeno (Aldrich, 30 % (w/w), hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado (Sigma, 98.5-102.0 %), hexacianoferrato (III) de potasio (Sigma, 99.4%), fenol (Prolabo, 99%), catecol (Sigma, 99%), 1-naftol (Merck), NADH (Sigma), NAD⁺ (Gerbú, 98.1%), 1-naftilfosfato (sal monosódica monohidratada, 1-NPP, Sigma), BSA (Gerbú, tipo VH), ácido ascórbico (Merck), ácido úrico (Sigma).

Todos los productos fueron reactivos de grado analítico y el agua utilizada fue obtenida de un sistema de purificación Millipore Milli-Q.

4.5. DISOLUCIONES

Se utilizaron las siguientes disoluciones reguladoras: 1) NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄ (PBS) de diferentes concentraciones y pH; 2) PBS 0.1 M de pH 7.5 ú 8.2 + Tween 20 al 0.01 % (B&W); 3) Trizma 0.1 M + MgCl₂ 1 mM de pH 9.0 (Trizma); 4) Tris-HCl 50 mM + NaCl 20 mM de pH 7.2 (Tris).

Las disoluciones de 3 α -HSD se prepararon disolviendo la enzima (50 unidades) en 500 mL de PBS 0.1 M de pH 7.4. La disolución patrón de androsterona, en concentración 1 mM, se preparó en medio acetonitrilo: PBS 0.1 M de pH 7.4, 1:1. Se prepararon también disoluciones patrón de cortisol, de 1 ó 0.5 mg/mL, en metanol; las disoluciones más diluidas se prepararon a partir de estas en regulador Tris. Las disoluciones de cortisol-AP se prepararon en el mismo regulador, en algún caso conteniendo BSA al 2%.

Se utilizó regulador Tris para preparar las disoluciones de prolactina, de AP-anti-PRL y de Strept-AP. Las disoluciones de anti-prolactina biotinilada se prepararon en regulador B&W. Las disoluciones patrón de ACTH y de Biotin-ACTH se prepararon en agua destilada; las disoluciones más diluidas se prepararon en PBS 0.05 M de pH 7.4. Este mismo regulador se utilizó para preparar las disoluciones de anti-ACTH.

Se preparó una disolución acuosa de nitrito sódico 0.2 mM. Las disoluciones de ácido 4-aminobenzoico se prepararon en HCl 1 M, y las de ácido 3-aminofenilborónico, en PBS de pH 8.2. Finalmente, se prepararon disoluciones 0.05 M de 1-naftilfosfato en regulador Trizma y disoluciones de BSA al 2 % en PBS y en Tris, así como disoluciones de peróxido de hidrógeno, NADH, NAD⁺, fenol, catecol y EDC/NHS, de distintas concentraciones, en regulador PBS 0.05 M de pH 7.4.

4.6. MUESTRAS

Se analizaron muestras de referencia de suero humano (European Reference Materials, ERM-DA 192 y ERM-DA193, Sigma) conteniendo 98.8 ng/mL o 277 ng/mL de cortisol, respectivamente. Las ampollas de vidrio conteniendo el suero liofilizado, se conservan a -40 °C y para su reconstitución, se adicionan 1.25 mL de agua destilada a 20°C, se agita suavemente durante 20 minutos, y se deja reposar 5 minutos. También se analizaron muestras de suero humano certificado (NIBSC, 74/555) conteniendo 10 μ g/mL de adrenocorticotropina humana. Estas muestras reconstituyen con 2.5 mL de agua destilada a 20 °C y se conservan del modo indicado anteriormente. Las muestras de orina certificadas (BioRad, Liquichek Urine Chemistry Control) conteniendo 53.1 a

103 ng/mL de cortisol, se analizaron directamente o previa dilución en regulador Tris de pH 7.2.

Para la validación de los métodos, se utilizaron también muestras de suero humano liofilizado (Sigma) contaminado con diferentes hormonas a diferentes niveles de concentración. Estas muestras se reconstituyen adicionando a la ampolla 1 mL de agua destilada o de la disolución del analito de interés, y mezclando cuidadosamente hasta su total disolución, pudiéndose alicuotar y congelar a -40 °C.

4.7. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.7.1. PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

4.7.1.1. Preparación de los electrodos compósitos MWCNTs/IL y MWCNTs/teflón

Las cantidades adecuadas de nanotubos de carbono y del aglutinante (líquido iónico o teflón) se pesaron en un vial de vidrio y se mezclaron manualmente con una varilla de vidrio hasta conseguir una pasta homogénea. Seguidamente se introdujo una porción de la pasta en una carcasa de teflón provista de un tornillo de acero inoxidable para establecer el contacto eléctrico. Una vez preparados, los electrodos se almacenaron en seco a temperatura ambiente. Antes de llevar a cabo las medidas, se pulió la superficie electródica sobre un papel suave.

4.7.1.2. Preparación del biosensor 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺

En primer lugar, se preparó la pasta mezclando manualmente 30 mg de MWCNTs, 70 mg de OPF₆ y 20 mg de NAD⁺ hasta obtener una mezcla homogénea. A continuación se procedió con la pasta del modo descrito anteriormente. Finalmente, se depositó una gota de 10 μ L de la enzima 3 α -HSD, y se dejó durante toda la noche en la oscuridad, en condiciones de humedad y a 4 °C hasta su uso.

4.7.1.3. Preparación de los electrodos compósitos AuNPs/MWCNTs/OPPF₆

En primer lugar se preparó una suspensión de oro coloidal. Para ello es necesario que el material de vidrio a utilizar se haya limpiado previamente con agua regia, aclarando varias veces con agua Milli Q previamente filtrada a vacío empleando un filtro de Nylon de tamaño de poro de 0.1 μm (Sharlau). Después, el material se dejó secar al aire durante 48 horas antes de su utilización. Seguidamente se prepararon las disoluciones de ácido tetracloroaurico al 1% y de citrato sódico al 1%, que se filtraron a través de una membrana microporosa de 22 μm . A continuación, se calentó hasta ebullición en vaso de precipitados una mezcla de 50 mL de agua Milli Q y 0.5 mL de HAuCl_4 . Tras hervir, se adicionaron 1.25 mL de la disolución de citrato sódico al 1%. Tras unos minutos, la disolución cambia de color adquiriendo finalmente un color rojo rubí característico. Transcurridos 15 minutos, se dejó enfriar y se agitó con la varilla de vidrio durante 15 minutos más. Finalmente, la suspensión de oro coloidal se almacenó en un recipiente de color topacio a 4 °C. Esta suspensión fue caracterizada mediante espectrofotometría UV-visible, observándose en el espectro la aparición de un máximo de absorción a 519 nm, característico de nanopartículas de oro con un tamaño medio de 16 nm [Wang, 2006].

Para la preparación de los electrodos compósitos AuNPs/MWCNTs/OPPF₆, se mezclaron manualmente 24 mg de MWCNTs, 76 mg del líquido iónico OPF₆ y 15.4 μL de oro coloidal hasta conseguir una pasta homogénea. Los electrodos de tamaño micrométrico se prepararon introduciendo una porción de pasta en un cilindro hueco de metacrilato de 500 μm de diámetro interno y comprimiendo suavemente, estableciendo el contacto con un alambre de acero inoxidable. Los electrodos de tamaño convencional se prepararon introduciendo la mezcla en un tubo de teflón hueco de 3 mm de diámetro interno.

4.7.1.4. Preparación del biosensor 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆

El biosensor 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ se preparó siguiendo el procedimiento anterior, mezclando los componentes en las cantidades indicadas junto con 0.05 unidades de enzima por 5 mg de pasta compósita.

4.7.2. PREPARACIÓN DE MAGNETOINMUNOSENSORES E INMUNOENSAYOS IMPLICADOS

4.7.2.1. Magnetoimmunosensor para prolactina

En primer lugar, se inmovilizó el anticuerpo (anti-PRL-Biotin) sobre la superficie de las micropartículas Strept-MBs. Para ello se depositó una alícuota de 2 μL de una suspensión de dichas partículas en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavó por duplicado con 100 μL de disolución reguladora B&W de pH 7.5. Cada etapa de lavado consistió en la resuspensión de las partículas magnéticas en la disolución de lavado mediante agitación vigorosa durante 1 minuto, seguido de la separación del sobrenadante con el tubo colocado en el separador de partículas durante 2 minutos, que es el tiempo recomendado en las especificaciones para asegurar que todas las partículas se encuentran fijadas por la acción del imán. A continuación se añadieron 50 μL de disolución de anti-PRL-Biotin de 17.5 $\mu\text{g/mL}$ preparada en disolución B&W de pH 7.5 y se incubó durante 45 minutos a 37 °C en un incubador-agitador. Transcurrido el tiempo de incubación, el tubo se colocó en el separador de partículas magnéticas durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y el conjugado anti-PRL-Biotin-Strept-MBs se lavó dos veces con 100 μL de disolución B&W de pH 7.5 y otra vez más con disolución Tris. Este proceso permite eliminar el anticuerpo no inmovilizado sobre las partículas magnéticas, quedando estas preparadas para llevar a cabo el procedimiento de inmunoensayo.

Seguidamente se estableció un esquema de tipo sándwich para la determinación de prolactina. Para ello, primero se resuspendió el conjugado anti-PRL-Biotin-Strept-MBs en 50 μL de una disolución de prolactina de concentración variable y se dejó 30 minutos en el incubador a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, el tubo se colocó en el separador de partículas durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante, y se lavó dos veces con 100 μL de disolución reguladora Tris para eliminar las especies no enlazadas. Después, el conjugado PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs se incubó en 100 μL de una disolución 1:500 de AP-anti-PRL durante 30 min a 37 °C y se lavó dos veces, como anteriormente, con 100 μL de disolución reguladora Tris. Finalmente, el conjugado AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs se resuspendió en 45 μL de

Trizma de pH 9 e inmediatamente antes de la medida, se inmovilizó sobre un SPCE con ayuda de un imán de neodimio colocado debajo del mismo. La determinación de prolactina se realizó por adición de 1- naftilfosfato 5 mM y medida de la respuesta voltamperométrica, después de un tiempo de espera de ocho minutos, mediante DPV en el intervalo de potencial de -0.15 a 0.6 V.

4.7.2.2. Magnetoimmunosensor para cortisol

En primer lugar se depositó 1 μ L de la suspensión de Protein A-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavó dos veces con la disolución B&W de pH 8.2. Seguidamente se separaron las partículas, imantando durante dos minutos y se desechó el sobrenadante. A continuación se añadieron 50 μ L de disolución de anti-cortisol de 1.5 μ g/mL preparada en la disolución B&W de pH 8.2 y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después, se lavó 2 veces con disolución B&W de pH 8.2, se imantó nuevamente, se desechó el sobrenadante y, por último, se lavó con disolución Tris.

Para diseñar el inmunoensayo de tipo competitivo simultáneo, las partículas magnéticas modificadas con anti-cortisol se resuspendieron en 100 μ L de una mezcla de cortisol (o muestra) y AP-cortisol (concentración final de 50 ng/mL) en medio Tris, y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos en un incubador provisto de agitación. Después, el conjugado AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs se lavó dos veces con disolución Tris y se resuspendió en 45 μ L de regulador Trizma para eliminar las especies no enlazadas. Por último, inmediatamente antes de la medida, el conjugado anterior se inmovilizó sobre un SPCE con ayuda del imán. La determinación de cortisol se realizó por adición de 1-naftilfosfato 0.05 M y medida de la respuesta voltamperométrica después de un tiempo de espera de ocho minutos, mediante DPV en el intervalo de potencial de -0.15 a 0.6 V.

4.7.3. PREPARACIÓN DE LOS INMUNOSENSORES BASADOS EN ELECTRODOS DE SUPERFICIE MODIFICADA CON SALES DE DIAZONIO E INMUNOENSAYOS IMPLICADOS

4.7.3.1. Electrodos modificados con ácido aminofenilborónico

La modificación de la superficie del electrodo serigrafiado (SPCE) y del electrodo serigrafiado dual (dual SPCE) con ácido 3-aminofenilborónico se realizó aplicando el procedimiento en las tres etapas siguientes: 1) reacción de diazotación del ácido aminobenzoico con NaNO_2 en medio HCl, e injertado “grafting” electroquímico; 2) activación de los grupos carboxilo con EDC/NHS, y 3) enlace covalente con ácido aminofenilborónico. Para ello, se disolvieron 20 mg de ácido *p*-aminobenzoico en 2 mL de HCl 1 M enfriando en un baño de hielo. Seguidamente se preparó la sal de diazonio adicionando gota a gota 38 μL de NaNO_2 0.2 mM por cada 200 μL de la disolución de *p*-aminobenzoico, con agitación constante en un baño de hielo. A continuación se depositaron 40 μL de esta disolución sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono y se realizaron 10 ciclos en voltamperometría cíclica entre 0.0 y -1.0 V, a 200 mV/s. Finalmente se lavaron abundantemente con agua y con metanol, dejando secar al aire. En la segunda etapa, se depositaron 10 μL de una disolución de EDC/NHS 0.1 M en cada uno, y se dejó reaccionar durante una hora. Hay que tener en cuenta que tiempos mayores pueden dar lugar a la hidrólisis de la succinimida. Finalmente, se lavó como anteriormente y, una vez seco, se adicionaron 10 μL de una disolución de ácido 3-aminofenilborónico (APBA) 50 mM. Después de 3 h, el electrodo modificado (SPCE/APBA) se lavó con agua y metanol y se dejó secar.

4.7.3.2. Inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE

Tras la modificación de la superficie electródica con APBA, de acuerdo con el procedimiento anterior, se procedió a la inmovilización del anticuerpo anti-ACTH depositando un volumen de 10 μL de una disolución de anti-ACTH de 30 $\mu\text{g/mL}$ sobre el APBA/SPCE, que se mantiene toda la noche a 4 °C. Tras lavar la superficie con regulador PBS de pH 7.4, se dejó secar y se procedió al bloqueo de la superficie

electródica para evitar adsorciones inespecíficas con 10 μ L de BSA al 2%, dejando 1 h a temperatura ambiente.

Una vez preparado el inmunosensor, se llevó a cabo el inmunoensayo de tipo competitivo, en el que el antígeno y el antígeno marcado con biotina compiten por los sitios de unión del anticuerpo. Para ello, se depositaron sobre el electrodo 10 μ L de una mezcla de ACTH de concentración variable (o la muestra) y Biotin-ACTH de 750 ng/mL, incubando durante 45 minutos a 4 °C. Seguidamente, se lavó, se adicionan 10 μ L de AP-Strept y después de 60 minutos mantenido a 4 °C, se lavó la superficie del electrodo con PBS 0.1 M de pH 7.4.

La determinación de ACTH se realizó por adición de 1-NPP 0.05 M y tras 8 minutos, por medida de la corriente de pico mediante DPV, en el intervalo de potencial de -0.15 a 0.6 V.

4.7.3.3. Inmunosensor dual AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE

El inmunosensor para la detección simultánea de ACTH y cortisol se preparó depositando sobre las superficies de los electrodos de trabajo 1 y 2, APBA-SPCE1 y APBA-SPCE2, 4 μ L de disolución de los anticuerpos anti-ACTH (30 μ g/mL) y anti-cortisol de (50 μ g/mL), respectivamente, dejando secar durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se depositó sobre cada electrodo una gota de 4 μ L de disolución de BSA al 2% para evitar adsorciones inespecíficas, dejando 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se llevó a cabo el inmunoensayo competitivo, depositando sobre cada uno de los electrodos 4 μ L de una mezcla de ACTH (o la muestra) y Biotin-ACTH de 1 μ g/mL, y cortisol (o la muestra) y AP-cortisol conteniendo un 2% de BSA, respectivamente, dejando durante 45 minutos a 4 °C. Finalmente, se depositaron 4 μ L de AP-Strept de 2 μ g/mL y 4 μ L de regulador Tris de pH 7.2 sobre los electrodos 1 y 2, respectivamente, dejando 60 minutos a 4 °C.

La determinación simultánea de ACTH y cortisol se llevó a cabo adicionando 45 μ L de regulador Trizma y 5 μ L de 1-NPP 0.05 M de forma que se cubra la superficie de ambos electrodos de trabajo, así como las de los electrodos auxiliar y de referencia.

Tras un tiempo de reacción de 8 minutos, se registraron simultáneamente los voltamperogramas en diferencial de impulsos en el intervalo de potencial comprendido entre -0.15 V a 0.60 V.

4.7.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS

4.7.4.1. Determinación de androsterona en suero con el biosensor 3 α -HSD/MWCNTs /OPPF₆/NAD⁺

Se analizaron muestras de suero humano enriquecido con androsterona al nivel de concentración 1.25 μ M (0.36 μ g/mL). Para la realización del análisis, se diluyó un volumen de 2 mL de muestra con 5.0 mL de disolución reguladora Tris 0.1 M de pH 8.5, y la determinación se llevó a cabo por detección del NADH formado, mediante amperometría en disoluciones agitadas a un potencial de +400 mV. Se aplicó el método de adiciones estándar realizando adiciones sucesivas de 100 μ L de una disolución patrón de androsterona 2.5×10^{-5} M.

4.7.4.2. Determinación de androsterona en suero con el biosensor 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆

Se analizó una muestra liofilizada de suero humano contaminada con la hormona a un nivel de concentración de 250 ng/mL. La determinación de androsterona se llevó a cabo por amperometría en disoluciones agitadas que contenían NAD⁺ 50 mM en medio PBS de pH 7.4, por medida de la respuesta de oxidación del NADH a un potencial de +300 mV.

4.7.4.3. Determinación de cortisol en suero y orina empleando un electrodo compuesto AuNPs/MWCNTs/OPPF₆

La muestra de suero analizada (ERM-DA 193), conteniendo 277 ng/mL de cortisol, se reconstituyó como se ha indicado anteriormente. La muestra de orina (BioRad, Liquichek urine chemistry control), con un contenido de cortisol comprendido entre 53.1 y 103 ng/mL, se analizó directamente, sin diluir y diluyendo en proporciones 10:1 y 100:1 con regulador Tris de pH 7.2. Una vez realizado el inmunoensayo, se llevó

a cabo la determinación de cortisol. Para ello se añadió a la suspensión del conjugado AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs, 5 μ L de 1-naftilfosfato 50 mM. Tras 8 minutos se separó la disolución con ayuda del imán y se transfirió a una célula electroquímica de 500 μ L. La respuesta de oxidación del 1-naftol generado en la reacción enzimática se monitorizó sobre un electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ mediante voltamperometría de onda cuadrada en el intervalo de potencial comprendido entre -0.15 y +0.60 V.

4.7.4.4. Determinación de prolactina en suero con el magnetoinmunosensor AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs

La muestra analizada fue un suero humano enriquecido con prolactina. En primer lugar se procedió a su reconstitución con 1 mL de disolución de prolactina de 200 ng/mL en medio regulador Tris de pH 7.2, mezclando cuidadosamente hasta su total disolución. Seguidamente se alicuotó y se conservó a -40 °C. Las muestras de suero conteniendo concentraciones menores de prolactina se prepararon por dilución del suero enriquecido con la hormona con un suero control reconstituido en el mismo regulador. Para la determinación de prolactina, se aplicó el procedimiento descrito en el Apdo. 4.7.2.1. a alícuotas de suero obtenidas por dilución, interpolando los valores de la corriente de pico en DPV en la porción lineal del calibrado de patrones de prolactina.

4.7.4.5. Determinación de cortisol en suero con el magnetoinmunosensor AP-cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs

Se analizaron muestras de suero humano certificado (ERM-DA 192 y ERM-DA 193) conservado y preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Apdo. 4.6. Para la determinación de cortisol, se aplicó el procedimiento resumido en el Apdo. 4.7.2.2. a alícuotas del suero obtenidas por dilución, interpolando, como en el caso anterior, los valores de la corriente de pico en DPV en la porción lineal del calibrado de patrones de cortisol.

4.7.4.6. Determinación de ACTH en suero con el inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE

La muestra de suero certificada (NIBSC, 74/555), reconstituida del modo descrito anteriormente, Apdo. 4.6., conteniendo 10 µg/mL de ACTH, se analizó aplicando el procedimiento 4.7.3.2. sustituyendo la disolución patrón de ACTH por el mismo volumen de suero, e interpolando en la porción lineal del calibrado de patrones de ACTH.

4.7.4.7. Determinación simultánea de ACTH y cortisol en suero con el inmunosensor dual AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol -APBA/SPCE

Las muestras de suero analizadas, que contienen mezclas de ACTH y cortisol, se prepararon a partir de las muestras de suero certificadas de ACTH (NIBSC, 74/555) y cortisol (European Reference Materials, ERM-DA 193, Sigma) que, una vez reconstituidas según las indicaciones del fabricante, contienen 10 µg/mL de ACTH y 277 ng/mL de cortisol, respectivamente.

A partir de las disoluciones anteriores, se prepararon mezclas conteniendo distintas concentraciones de las dos hormonas y uno de los dos conjugados, ACTH-biotina o cortisol-AP. Estas mezclas se depositan sobre cada uno de los dos electrodos de trabajo modificados con cada uno de los dos anticuerpos, anti-ACTH y anti-cortisol, respectivamente. De esta forma se determinan de forma simultánea las dos hormonas midiendo la corriente de pico de los voltamperogramas en diferencial de impulsos de cada uno de los dos electrodos de trabajo e interpolando los valores obtenidos en la porción lineal del calibrado de patrones correspondiente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.1. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN ELECTRODOS COMPÓSITOS DE NANOTUBOS DE CARBONO Y LÍQUIDO IÓNICO

Los electrodos compósitos basados en pastas de nanotubos de carbono han demostrado ser útiles para la detección de especies como peróxido de hidrógeno, NADH o algunos fenoles, implicadas en varias reacciones enzimáticas usadas en el desarrollo y aplicaciones de muchos biosensores [Agüí, 2008]. Además, se sabe que la preparación de híbridos de nanotubos de carbono con otros materiales, como las nanopartículas metálicas, mejora las características electroquímicas y facilita la inmovilización de las biomoléculas [Manso, 2008]. Más recientemente, la inclusión de un líquido iónico como agente aglutinante en el material compósito ha permitido incrementar la conductividad de la mezcla al tiempo que proporcionar una mejor relación señal/ruido [Opallo, 2011].

Nuestro Grupo tiene experiencia en la preparación de electrodos compósitos a base de materiales de carbono, incluidos los nanotubos de pared múltiple, y de híbridos con nanopartículas de oro, empleando mayoritariamente teflón como aglutinante. Partiendo de esta base, en este capítulo se explora la fabricación de mezclas compósitas nanoestructuradas en presencia de un líquido iónico, para su aplicación a la preparación de sensores y biosensores electroquímicos de utilidad para la detección de hormonas.

5.1.1. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES COMPÓSITOS

Se utilizaron dos líquidos iónicos, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIMPF₆) y hexafluorofosfato de n-octilpiridinio (OPPF₆). El primero es líquido a temperatura ambiente, mientras que el segundo es un polvo sólido y pegajoso. Además, con el fin de establecer comparaciones con otras pastas de nanotubos en las que el Grupo tiene experiencia, se prepararon también mezclas con teflón (politetrafluoroetileno), un aglutinante sólido no conductor. En el Apdo. 4.7.1.1. se ha descrito el procedimiento utilizado para la fabricación de las pastas, que se ha representado de forma esquemática en la Figura 20. Como ya se ha indicado, los componentes, MWCNTs y uno de los dos líquidos iónicos o el teflón, se mezclan manualmente y el material resultante se introduce en una carcasa de electrodo vacía provista de un tornillo metálico, quedando así lista para su empleo.

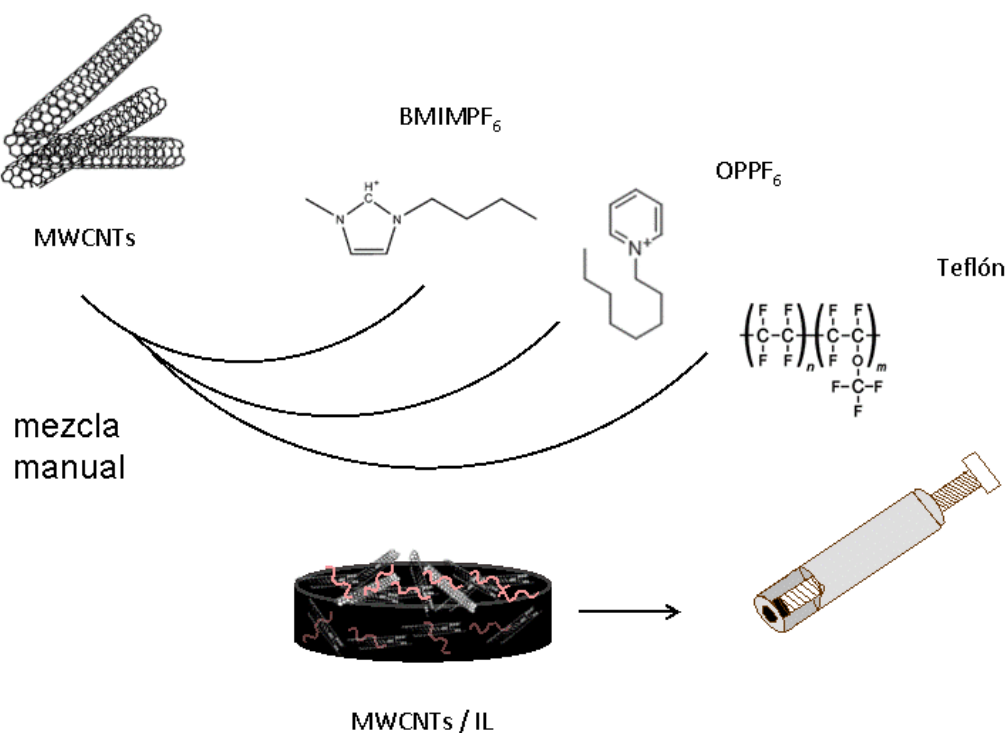


Figura 20.- Esquema de la preparación de los materiales compósitos y los electrodos MWCNTs/BMIMPF₆, MWCNTs/OPPF₆ y MWCNTs/teflón.

Con el fin de seleccionar el líquido iónico más apropiado, así como de caracterizar los electrodos y optimizar la composición de la pasta, se realizaron estudios mediante espectroscopía de impedancia electroquímica y voltamperometría cíclica con los resultados que se describen a continuación.

5.1.1.1. Estudios mediante espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopia de impedancia electroquímica es una técnica de gran utilidad para investigar las características superficiales de los electrodos modificados. En este trabajo se empleó esta técnica para estudiar las propiedades de los electrodos preparados con dos mezclas compósitas diferentes, basadas en los líquidos iónicos BMIMPF₆ y OPF₆. Para ello, se registraron los espectros de impedancias de los electrodos correspondientes, empleando distintas proporciones MWCNTs/IL. En primer lugar se muestran los resultados obtenidos empleando BMIMPF₆ (Figura 21). A partir de los diagramas de Nyquist que aparecen en dicha figura, se calcularon los valores de la resistencia a la transferencia de carga, R_{ct} , que se han resumido en la Tabla 5.

Como puede observarse, los valores de la resistencia a la transferencia de carga, tomados a partir del diámetro del semicírculo del diagrama de Nyquist, son muy bajos, si bien, como era de esperar, a medida que aumenta el porcentaje de líquido iónico y, por tanto, disminuye el de nanotubos de carbono en la matriz electródica, se observa un ligero aumento de R_{ct} . Esta tendencia se atribuye a que una proporción progresivamente más elevada de líquido iónico rellena mejor los huecos entre los nanotubos de carbono de la matriz compósita, disminuyendo la cantidad de sitios activos de su superficie [Musameh, 2008 BB]. Por otro lado, en el caso de la mezcla compósita que contiene el porcentaje más elevado de nanotubos de carbono, 30% (menor proporción de líquido iónico), no se observa semicírculo en la zona de altas frecuencias del diagrama de Nyquist, lo que indica un control difusivo en todo el intervalo de frecuencias estudiado. Asimismo, hay que mencionar que la presencia de semicírculos “deprimidos” en la zona de altas frecuencias de este diagrama, implica una desviación del comportamiento capacitivo ideal de la interfase electrodo-

disolución, habitual en los electrodos sólidos. Esta desviación se debe a la modificación de la distribución de carga de la doble capa debida a la rugosidad y a la distribución de sitios activos en la superficie electródica, característica de las mezclas compósitas [Katz, 2003; Liu, 2005; Zhang, 2007] y se plasma en el circuito de Randles (Figura 22) sustituyendo el condensador por un elemento de fase constante, CPE.

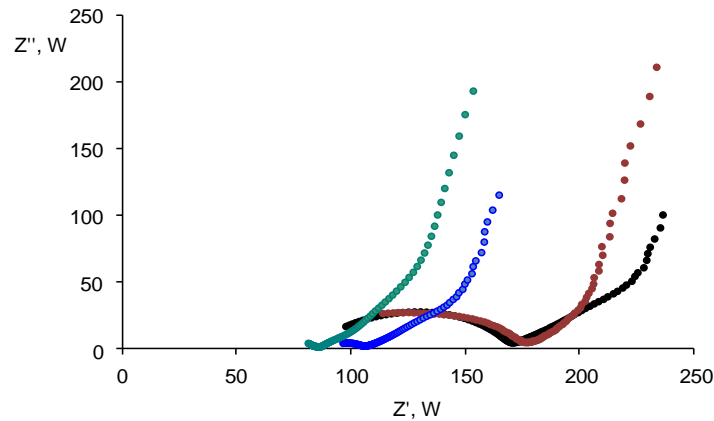


Figura 21.- Diagramas de Nyquist de electrodos compósitos basados en mezclas MWCNTs/BMIMPF₆: (●) 30:70; (●) 25:75; (●) 15:85; (●) 5:95; Fe(CN)₆^{4-/3-} 5 mM KCl 0.1 M.

Tabla 5.- Valores de R_{ct} para los electrodos MWCNTs/BMIMPF₆.

CNT:IL	5/95	15/85	25/75	30/70
R_{ct}, Ω	85.8	78.8	21.2	-

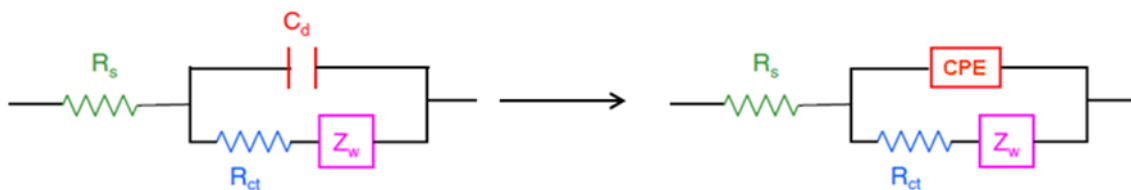


Figura 22.- Circuito de Randles para un electrodo convencional (izda.) y para un electrodo compósito (dcha.).

En la Figura 23 se han representado los espectros correspondientes a los electrodos preparados con mezclas MWCNTs/OPPF₆ utilizando diferentes proporciones de ambos componentes. En este caso, como puede observarse, los diagramas de Nyquist muestran una región circular tan solo a frecuencias muy elevadas, que solo es visible si se amplía la escala de la representación. Esto indica que

el proceso está controlado por difusión prácticamente en todo el intervalo de frecuencias estudiado.

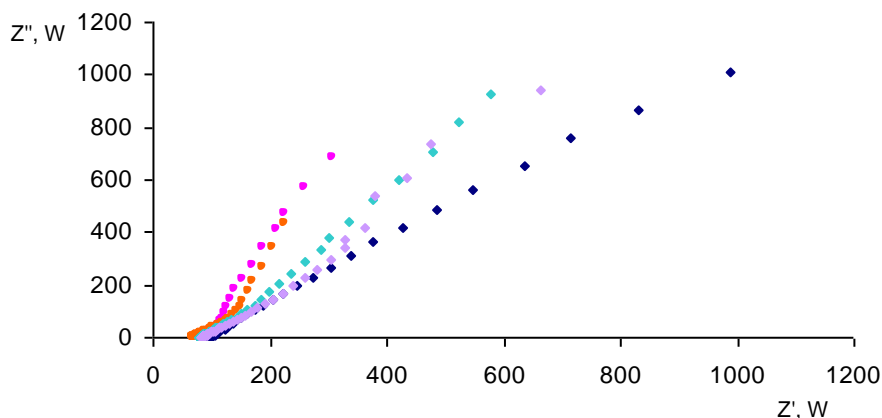


Figura 23.- Diagramas de Nyquist de electrodos compósitos basados en mezclas MWCNTs/OPPF₆ (●) 10:90; (●) 20:80; (●) 25:75; (●) 30:70; (●) 40:60; Fe(CN)₆^{4-/3-} KCl 0.1 M.

Finalmente, cuando se comparan los espectros de impedancia de los electrodos preparados con un mismo porcentaje de BMIMPF₆ u OPPF₆, se observa una mayor resistencia a la transferencia de carga en el primer caso. Como ejemplo, en la Figura 24 se han representado los diagramas de Nyquist para ambos electrodos preparados en una proporción MWCNTs/IL de 30:70 (w/w).

En la misma figura se comparan los espectros de impedancia de las mezclas compósitas MWCNTs/IL con el correspondiente a una mezcla MWCNTs-teflón en la proporción 50:50 (w/w) optimizada previamente en nuestro grupo de investigación [Manso, 2008]. Como puede observarse, la resistencia a la transferencia de carga es muy superior cuando se emplea teflón, apareciendo un semicírculo en la zona de altas frecuencias que no se aprecia en el diagrama de Nyquist de los electrodos preparados con líquidos iónicos. Estos resultados ponen de manifiesto que el empleo como aglutinante de cualquiera de estos líquidos iónicos en lugar de teflón, proporciona una menor resistencia a la transferencia de carga para las superficies electródicas resultantes, a pesar de poseer el material compósito una menor proporción de nanotubos de carbono que el basado en el empleo de teflón. Esto se atribuye al carácter aislante de este polímero y a su elevada hidrofobicidad.

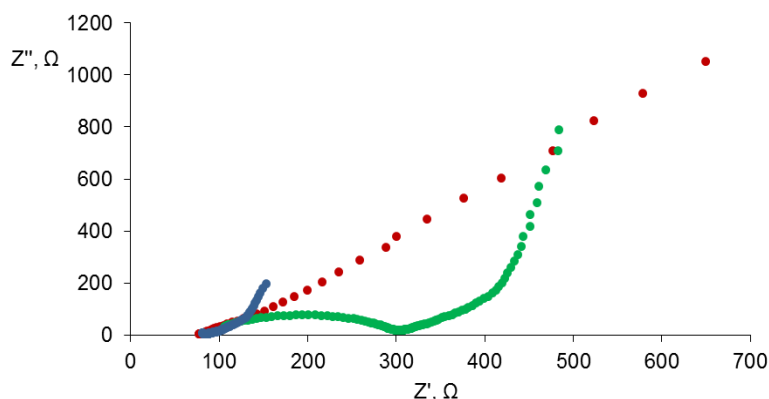


Figura 24.- Diagramas de Nyquist de electrodos compósitos basados en mezclas:
 (●) MWCNTs/BMIMPF₆ (30:70); (●) MWCNTs/OPPF₆ (30:70); (●) MWCNTs/teflón (50:50);
 Fe(CN)₆^{4-/3-} 5 mM KCl 0.1 M.

5.1.1.2. Estudios mediante voltamperometría cíclica

Se investigó el comportamiento de los electrodos MWCNTs/IL frente a un sistema electroactivo rápido, como es el del ferrocianuro, habiéndose representado en la Figura 25 algunos de los resultados obtenidos. Como puede observarse, el voltamperograma cíclico registrado frente al electrodo MWCNTs/BMIMPF₆ (Fig. 25a) presenta una corriente de fondo muy elevada, y los picos de oxidación y de reducción típicos del sistema ferro-ferricianuro no aparecen bien definidos, ni siquiera aplicando la baja velocidad de barrido de potencial indicada (5 mV/s). Por el contrario, cuando se emplea OPF₆ (Fig. 25b), el voltamperograma cíclico muestra los picos anódico y catódico característicos, con un alto grado de reversibilidad. La diferencia de comportamiento entre ambos compuestos puede deberse a su diferente estado físico: en el BMIMPF₆, líquido, la movilidad iónica es mayor, y también lo es la corriente de carga. Por otro lado, al ser el BMIMPF₆ más hidrofílico, puede producirse un incremento en la capacitancia de la doble capa, como resultado de la mayor interacción entre los iones en disolución y las moléculas de agua [Kachoosangi, 2009].

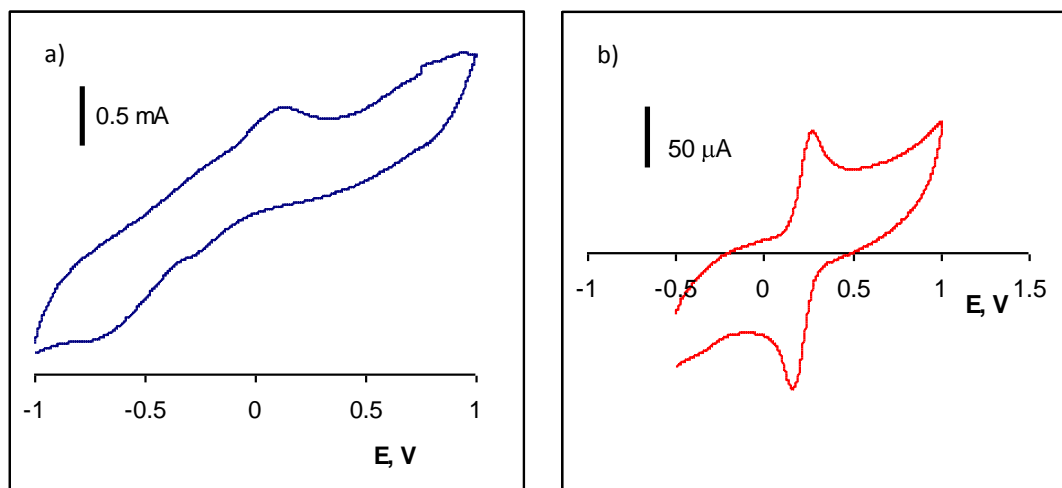


Figura 25.- Voltamperogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5 mM en KCl 0.1 M:
a) MWCNTs/BMIMPF₆ 30:70; b) MWCNTs/OPPF₆ 30:70; $v = 5 \text{ mV/s}$.

Estos resultados llevaron a elegir el líquido iónico OPF₆ como más adecuado para preparar las mezclas compósitas con nanotubos de carbono.

5.1.1.3. Influencia de la proporción MWCNTs/OPPF₆

Una vez seleccionado el líquido iónico a utilizar como aglutinante para la fabricación de las mezclas, se estudió la influencia de la proporción relativa de sus componentes en el comportamiento de los electrodos. En la Figura 26 se han representado algunos voltamperogramas cíclicos de disoluciones de ferrocianuro obtenidos sobre electrodos MWCNTs/OPPF₆ preparados con proporciones respectivas comprendidas entre 10:90 y 36:64 (w/w). Como puede observarse, para porcentajes de OPF₆ del 65% o superiores, la forma de los voltamperogramas es la característica del sistema electroquímico investigado. Sin embargo, cuando el porcentaje disminuye hasta el 64 %, el aspecto del voltamperograma obtenido es completamente distinto, aumentando considerablemente la corriente de fondo. Este cambio drástico se debe a que la disminución del porcentaje de líquido iónico por debajo de un cierto nivel, va unida a una considerable pérdida de compacidad de la pasta y a un aumento de la porosidad, lo que permite un fácil acceso de la disolución al interior de la matriz compósita tridimensional y justifica el citado incremento brusco de la corriente de fondo. Por el contrario, cuando se utilizan proporciones elevadas de líquido iónico en

el material compósito, este rellena los huecos entre los nanotubos de carbono, dando lugar a una mayor aglutinación o compacidad del compósito, lo que se traduce en una menor corriente de fondo y una mayor estabilidad mecánica del electrodo.

En el caso de las mezclas compósitas MWCNTs/BMIMPF₆, no fue posible realizar un estudio paralelo con fines comparativos, ya que la elevada corriente de fondo dificultó la obtención de voltamperogramas cíclicos reproducibles y bien definidos a diferentes proporciones de ambos materiales.

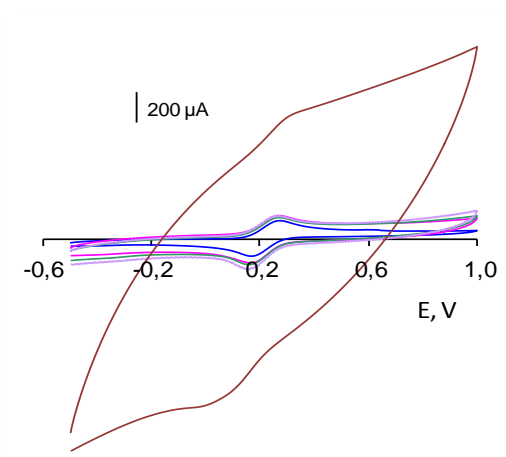


Figura 26.- Voltamperogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre electrodos compósitos preparados con distintas proporciones MWCNTs/OPPF₆: (—) 10:90; (—) 20:80; (—) 30:70; (—) 35:65; (—) 36:64; $v = 100 \text{ mV/s}$.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se eligió como más adecuada para estudios posteriores la mezcla MWCNTs/OPPF₆ en proporción 30:70.

5.1.1.4. Comportamiento voltamperométrico de varios compuestos de interés sobre el electrodo MWCNTs/OPPF₆

Una vez seleccionado el tipo de mezcla compósita y optimizada la proporción de sus componentes, se estudió el comportamiento electroquímico de diversas especies de interés, con vistas a la aplicación de este material al desarrollo de biosensores. Las especies elegidas fueron NADH, empleado en la implementación de biosensores de deshidrogenasas, catecol, utilizado como mediador redox en los biosensores de peroxidasa, y 1-naftol y fenol, productos de la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina en las configuraciones de inmunosensores marcados con dicha

enzima. En la Figura 27 se han representado los voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre el electrodo compósito MWCNTs/OPPF₆ 30:70 (w/w) comparando los resultados con los proporcionados por un electrodo MWCNTs/teflón preparado en la misma proporción.

Como puede observarse, los voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre el electrodo compósito preparado con OPPF₆ están mejor definidos, en general, y presentan menor corriente de fondo que los correspondientes al electrodo MWCNTs/teflón. En el caso del fenol, el voltamperograma sobre MWCNTs/OPPF₆ muestra, como era de esperar, un único pico de oxidación, que no aparece sobre el electrodo MWCNTs/teflón. Por otra parte, el 1-naftol también exhibe un único pico de oxidación, que está mejor definido sobre el electrodo preparado con el líquido iónico. En cuanto, al NADH, no es posible observar ningún pico sobre el electrodo MWCNTs/teflón, debido a la elevada corriente de fondo, pero sí sobre el MWCNTs/OPPF₆. Finalmente, el catecol exhibe un comportamiento más reversible sobre el electrodo MWCNTs/OPPF₆ que sobre MWCNTs/teflón.

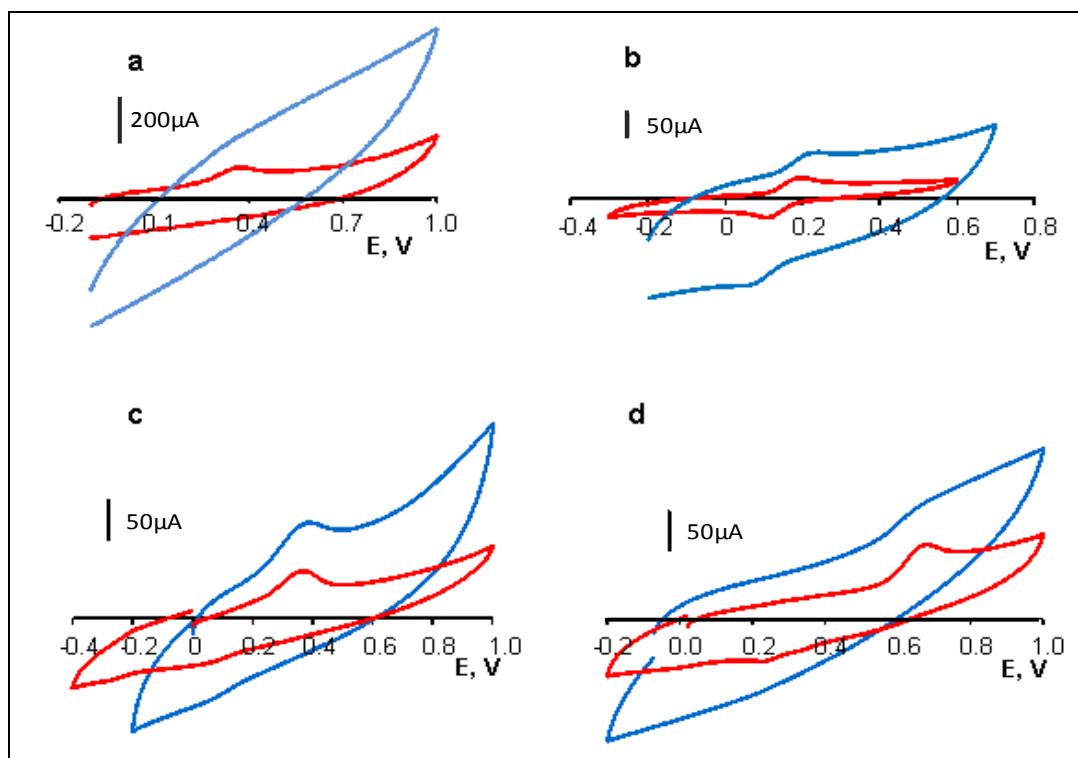


Figura 27.- Voltamperogramas cíclicos de: a) NADH 5 mM; b) catecol 1 mM; c) 1-naftol 1 mM y d) fenol 1 mM; — MWCNTs/teflón 30:70 (w/w); — MWCNTs/OPPF₆ 30:70 (w/w) PBS 0.05 M, pH 7.4; $\nu = 100$ mV/s.

El conjunto de estos resultados permite concluir que los electrodos MWCNTs/OPPF₆ preparados en la proporción 30:70 son adecuados para la detección de los compuestos ensayados. En esta parte de la Memoria interesa particularmente el buen comportamiento observado hacia la oxidación del NADH, que hace posible su aplicación al desarrollo de biosensores basados en enzimas deshidrogenasas.

5.1.1.5. Estudio del material compuesto AuNPs/MWCNTs/OPPF₆

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, así como la experiencia del Grupo en otras aplicaciones, se investigó la preparación de electrodos basados en materiales híbridos de nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y el líquido iónico OPPF₆. En la Figura 28 se comparan los voltamperogramas cíclicos de NADH, ferrocianuro y catecol obtenidos sobre electrodos AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ (curvas continuas) y MWCNTs/OPPF₆ (curvas discontinuas). Puede observarse cómo, sobre todo en el caso del ferricianuro y el catecol, los electrodos preparados con nanopartículas de oro proporcionan respuestas más intensas y mejor definidas. Los voltamperogramas del NADH no muestran diferencias tan notables, debido a las elevadas corrientes de fondo, si bien se aprecia la obtención de una corriente de oxidación más elevada y un ligero desplazamiento del potencial de pico hacia valores menos positivos cuando se utiliza el electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆. El incremento de la corriente en presencia de las nanopartículas de oro se debe al aumento de la velocidad de transferencia electrónica, que no se aprecia tan claramente en el caso del NADH debido a que el proceso de oxidación electroquímica de este compuesto es más complejo y en él están involucradas reacciones superficiales [Musameh, 2002].

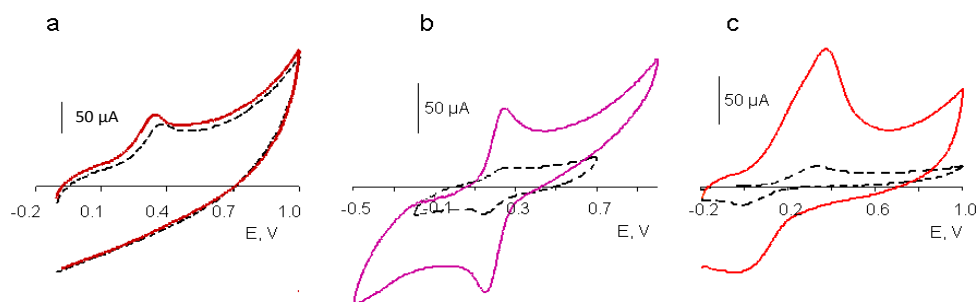


Figura 28.- Voltamperogramas cíclicos sobre: AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ (—) y MWCNTs/OPPF₆ (---) de NADH 5 mM (a), ferrocianuro 5 mM (b) y catecol 1 mM (c); PBS 0.05M pH 7.4; $v = 100$ mV/s.

Influencia de la cantidad de nanopartículas de oro

Debido al buen comportamiento observado anteriormente para la respuesta electroquímica del ferrocianuro, se empleó una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM para optimizar la composición de la pasta $\text{AuNPs}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6$, registrándose voltamperogramas cíclicos sobre electrodos preparados por adición de 7.7 μL de suspensión de oro coloidal por cada 12 mg de nanotubos, así como con distintas proporciones de nanotubos y OPPF_6 en el intervalo 24/76 a 33/67 (w/w). Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 29, en la que se aprecia que al aumentar la cantidad de nanotubos y, consecuentemente, la de nanopartículas de oro, se obtienen corrientes más altas, debido probablemente al incremento del área superficial. Sin embargo, la corriente de fondo también aumenta en el mismo sentido, por lo que la relación señal/fondo no varía de forma apreciable en todo el intervalo estudiado. Por otro lado, cuando la proporción de OPPF_6 disminuye por debajo del 70%, se aprecia un fuerte incremento de la corriente de fondo acompañado de una elevada falta de estabilidad del material compósito. Estos resultados se deben probablemente a que al aumentar la proporción de MWCNTs y de nanopartículas de oro disminuye la de líquido iónico, lo que proporciona una mayor porosidad a la pasta, que es el fenómeno responsable de que aparezca una mayor corriente de fondo. Teniendo en cuenta estos resultados, se eligió una proporción MWCNTs/ OPPF_6 de 24/76 w/w, añadiendo, como se ha dicho, 7.7 μL de oro coloidal por 12 mg de nanotubos, para la preparación de la pasta.

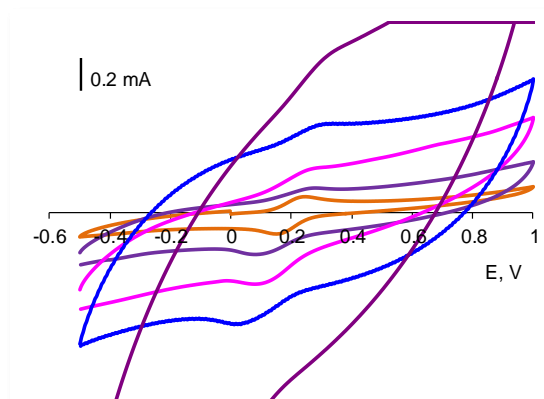


Figura 29.- Voltamperogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M sobre electrodos compósito preparados con 7.7 μL AuNPs y MWCNTs/ OPPF_6 : (—) 24:76; (—) 25:75; (—) 27.7:72.3 (—) 30:70 (—) 33: 67. $v = 100 \text{ mV/s}$.

Caracterización de los electrodos AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ por espectroscopía de impedancia electroquímica

En la Figura 30 se han representado los espectros de impedancias de una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M obtenidos sobre los electrodos compósitos MWCNTs/OPPF₆ y AuNPs/MWCNTs/OPPF₆. Como puede observarse, las curvas muestran escasas diferencias, como corresponde a la ligera variación en la conductividad de la pasta que produce la adición de una pequeña cantidad de nanopartículas de oro. Aunque la presencia de estas nanopartículas en el material proporciona una resistencia a la transferencia de carga algo inferior, sin embargo, en ambos casos se observa un único tramo lineal en los diagramas de Nyquist, lo que confirma que el proceso faradaico de la sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ está controlado por difusión en todo el intervalo de frecuencias ensayado para ambas superficies electródicas.

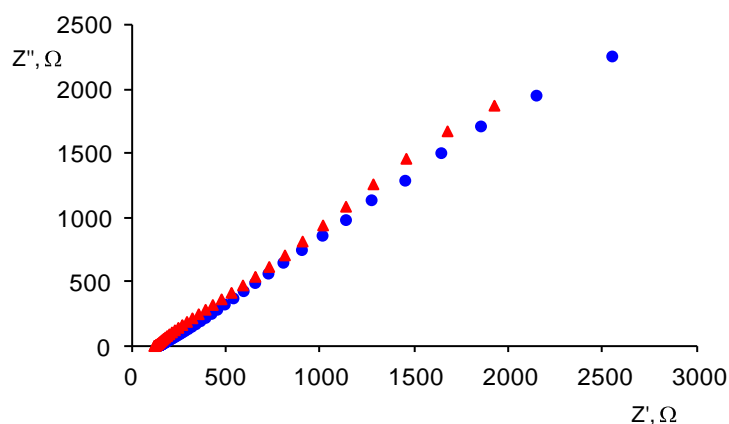


Figura 30.- Diagramas de Nyquist de electrodos compósitos: (▲) AuNPs/MWCNTs/OPPF₆, y (●) MWCNTs/OPPF₆; $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M.

**5.1.2. BIOSENSOR PARA ANDROSTERONA BASADO EN
UN ELECTRODO COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE
CARBONO, LÍQUIDO IÓNICO Y NAD⁺**

Como se ha indicado en el Apdo. 3.2.1., la puesta a punto de métodos para la determinación sensible y selectiva de androsterona tiene un gran interés debido principalmente a las propiedades anabolizantes de esta hormona esteroidea. Por otro lado, de lo visto anteriormente en relación a las propiedades del material compósito MWCNTs/OPPF₆, se desprende la posibilidad de utilizar los electrodos basados en dicha mezcla para la detección de NADH y, consecuentemente, como soporte para la preparación de biosensores electroquímicos de deshidrogenasas. Teniendo esto en cuenta y, con el fin de demostrar esta utilidad, se desarrolló un biosensor enzimático para la determinación de androsterona por inmovilización de la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3 α -HSD, sobre la superficie de un electrodo compósito MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺. Aparte de su excelente conductividad y actividad electrocatalítica, la incorporación del cofactor a la matriz del electrodo supone una interesante estrategia para mejorar su actuación en la reacción enzimática, lo que hace posible alcanzar una mayor rapidez, estabilidad y sensibilidad en la detección de NADH.

5.1.2.1. Configuración del biosensor

Los procedimientos para la preparación del electrodo compuesto MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ y del biosensor enzimático 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ se han descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.7.1.2.). En la figura 31 se muestra un esquema que ilustra de forma simplificada dichos procedimientos, así como el funcionamiento del biosensor. Como puede observarse, una vez obtenida la mezcla e introducida en el electrodo, la enzima se inmoviliza por adsorción sobre su superficie y, para la determinación, se lleva a cabo la detección amperométrica del NADH generado en la reacción enzimática.

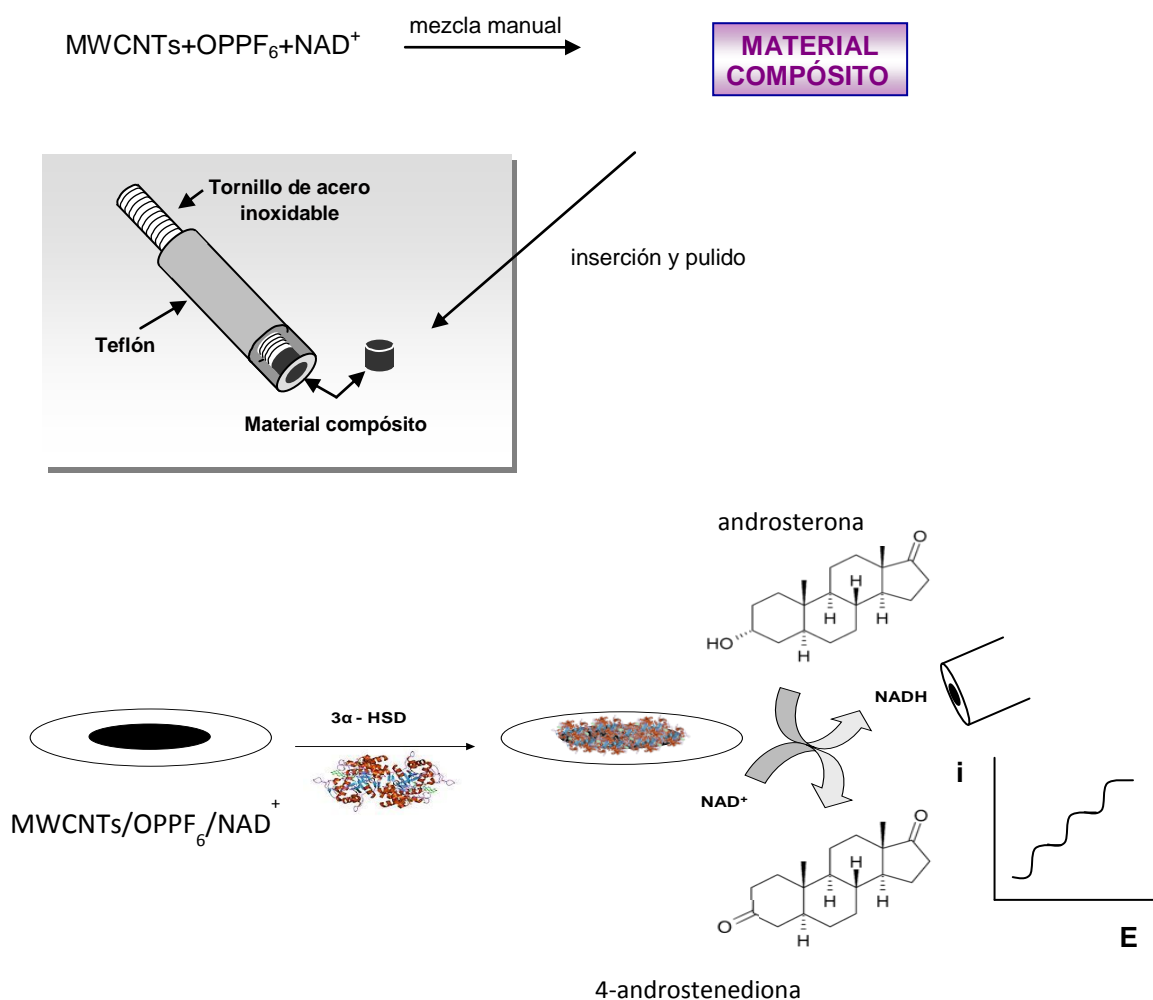


Figura 31.- Esquema de la preparación y funcionamiento del biosensor.

5.1.2.2. Optimización de las variables experimentales

Teniendo en cuenta los parámetros optimizados anteriormente, relacionados con la fabricación del material compósito de nanotubos de carbono y líquido iónico, en este apartado se estudian las variables que afectan a la construcción del biosensor electroquímico de 3 α -HSD y a la determinación de androsterona basada en la detección de NADH.

Elección del potencial de medida

Para elegir el potencial óptimo de medida, se investigó la influencia de dicha variable sobre la corriente en estado estacionario de NADH 5 mM sobre el electrodo MWCNTs/OPPF₆, con los resultados que se muestran en la Figura 32. Como puede observarse, la magnitud de la respuesta de oxidación aumenta con el potencial aplicado en todo el intervalo estudiado, obteniéndose valores de corriente apreciables a partir de un potencial de 300 mV. Este comportamiento llevó a elegir un potencial de 400 mV para llevar a cabo la detección, donde se encuentra una mayor relación entre la corriente medida y el fondo.

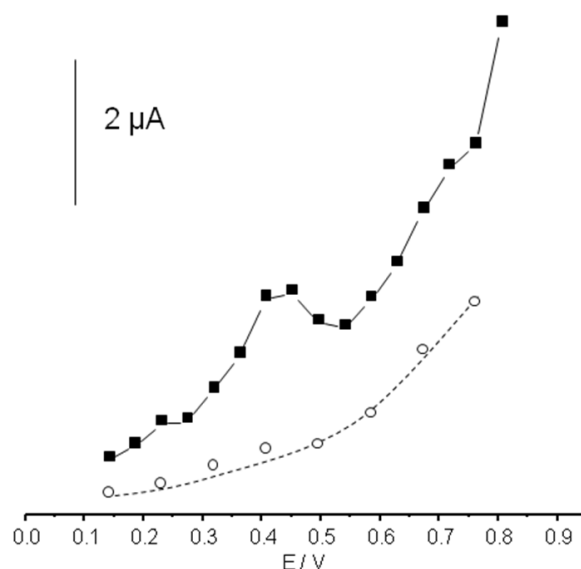


Figura 32.- Variación de la corriente con el potencial para NADH 5 mM sobre un electrodo (—) MWCNTs/OPPF₆; (---) PBS 0.1 M pH 7.4.

Utilizando el potencial optimizado anteriormente, se obtuvo un calibrado de NADH en el intervalo de concentraciones comprendido entre 2.0×10^{-5} y 12.0×10^{-5} M en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4, con una pendiente de $32.6 \mu\text{A}/\text{mM}$. Es importante destacar que, cuando se compara con algunas de las escasas configuraciones electrónicas similares, este valor es uno de los más altos de los encontrados en la bibliografía. Así, por ejemplo, es aproximadamente el doble que el encontrado utilizando un electrodo compuesto de nanotubos de carbono y teflón, $17.3 \mu\text{A}/\text{mM}$ aplicando 300 mV [Manso, 2008], y ligeramente superior a la obtenida con un electrodo compuesto de nanotubos de carbono y resina epoxi, $29.7 \mu\text{A}/\text{mM}$, si bien aplicando en este caso un potencial de 550 mV [Pumera, 2006]. Finalmente, la pendiente es más de 10 veces superior a la obtenida con un electrodo de carbono vitrificado modificado con un compuesto de nanotubos de carbono y el líquido iónico bis(trifluorometil-sulfonil) imida de N-butil-N-metilpirrolidinio ($[\text{C}_4\text{mpyr}][\text{NTf}_2]$) ($2.4214 \mu\text{A}/\text{mM}$) [Teymourian, 2012] y del mismo orden de magnitud que la obtenida por Wang y colaboradores empleando un electrodo de carbono vitrificado modificado con el material compuesto de nanotubos de carbono, el líquido iónico tetrafluoroborato de butilmetilimidazolio (BMIMBF_4) y quitosan (CHIT) [Wang, 2007].

Influencia de la cantidad de NAD^+

Para estudiar la influencia de la cantidad de cofactor NAD^+ incorporado al material del electrodo sobre la respuesta del biosensor, se midió la señal amperométrica de varias disoluciones de androsterona en concentración 2.0, 4.0 y 6.0×10^{-6} M sobre electrodos preparados con proporciones de NAD^+ comprendidas entre 0 y 40% en peso (mg NAD^+ por cada 100 mg) en la pasta compuesta. Como puede observarse en la Figura 33, la pendiente del calibrado de androsterona aumenta conforme aumenta el porcentaje de NAD^+ en la pasta, hasta alcanzar un 20%. Por encima de ese valor, se observa una disminución de la corriente, lo que puede atribuirse al ensuciamiento de la superficie electrónica producido por la presencia de un exceso de cofactor [Chakraborty, 2007]. Por ello, se eligió el porcentaje citado como óptimo para estudios posteriores.

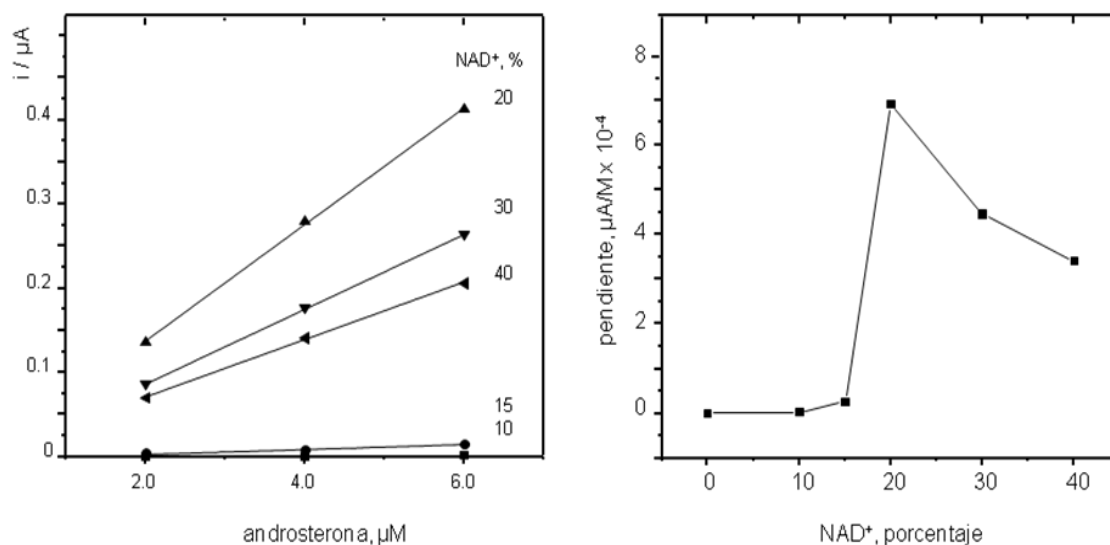


Figura 33.- Influencia del porcentaje de NAD⁺ en la matriz compósita del biosensor 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺. E = 400 mV; regulador TRIS 0.1 M pH 8.5.

Influencia del pH

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad, se estudió también la influencia del pH sobre la respuesta amperométrica del biosensor, en el intervalo de pH 6.0 a 10.0, utilizando diferentes disoluciones reguladoras fosfato 0.1 M para su ajuste. En la Figura 34 se ha representado la variación de la pendiente media del calibrado de androsterona entre 2.0×10^{-6} y 6.0×10^{-6} M en función de dicha variable. Se observa un marcado aumento de esta pendiente para valores de pH entre 7.0 y 8.5, decreciendo de forma acusada para valores de pH superiores. Este comportamiento está de acuerdo con el observado por Teodorczyk y col. [Teodorczyk, 1990], en el único biosensor electroquímico enzimático descrito en la bibliografía basado en la enzima 3 α -HSD, y se debe a la mayor actividad de la misma a pH alcalino [Penning, 1996]. Con el fin de obtener la mayor sensibilidad, se seleccionó un pH de 8.5 para estudios posteriores. Por otro lado, se eligió como mezcla reguladora más adecuada para el control de este valor de pH, una disolución de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, $\text{pK}_a = 8.06$) [Gomori, 1955], de concentración 0.1 M.

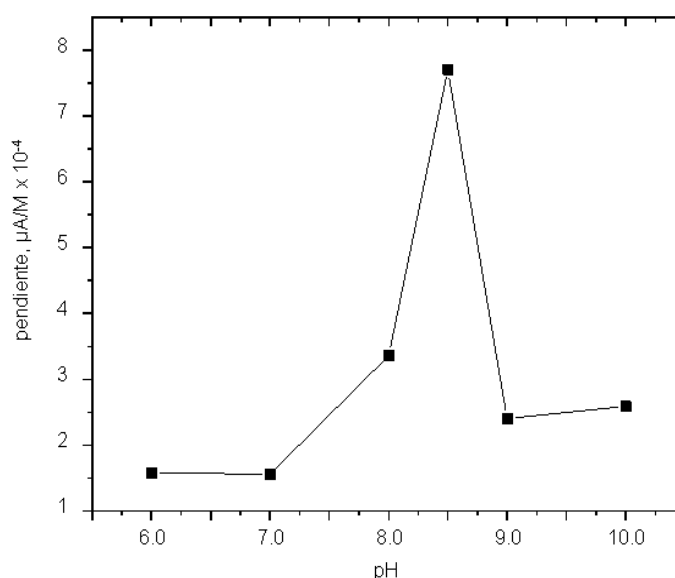


Figura 34.- Influencia del pH sobre la respuesta del biosensor.

Influencia de la cantidad de enzima

La cantidad de enzima inmovilizada por adsorción sobre la superficie del electrodo se optimizó mediante la obtención de calibrados de androsterona en el intervalo de concentraciones de 0 a 8.0×10^{-6} M, empleando diferentes biosensores contruidos con 0.3, 0.7 y 1.0 unidades de 3α -HSD. Como era de esperar, la pendiente más alta se obtuvo para la mayor cantidad de enzima por lo que se eligió dicho valor para estudios posteriores. No se realizaron ensayos con cantidades superiores, para evitar el aumento del coste de biosensor.

5.1.2.3. Calibrado y características analíticas

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas previamente, se obtuvo un calibrado para androsterona sobre el biosensor de 3α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ (Figura 35). El intervalo dinámico lineal está comprendido entre 0.5 y 10 μM de hormona, y el valor de la pendiente fue de $70.3 \mu\text{A/mM}$ ($r = 0.998$). A pesar de que el potencial de detección es relativamente bajo, esta pendiente es más de doscientas veces mayor que la obtenida con un electrodo de carbono vitrificado modificado con 3α -HSD y glutaraldehído, a un potencial de 600 mV [Teodorczyk, 1990]. El límite de

detección, $0.15 \mu\text{M}$, se calculó aplicando el criterio $3s_b/m$, donde la m es la pendiente de la región lineal del calibrado, y s_b es una estimación de la desviación estándar del blanco, obtenida por medida repetida ($n=10$) de las señales amperométricas correspondientes a la concentración más baja medible del calibrado, $0.5 \mu\text{M}$.

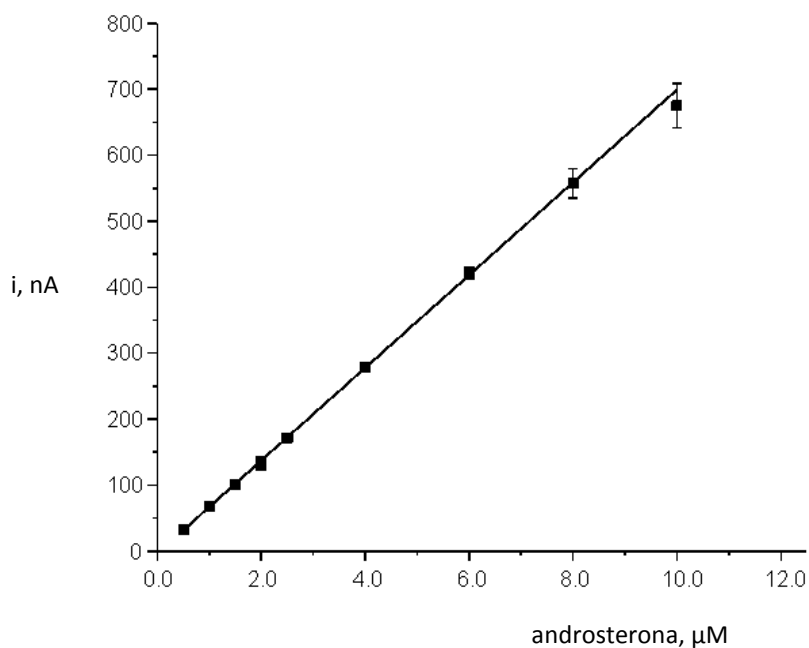


Figura 35.- Calibrado para androsterona sobre el biosensor $3\alpha\text{-HSD/MWCNTs/OPPF}_6/\text{NAD}^+$.

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

Los estudios de repetibilidad de las medidas se realizaron a partir de las señales amperométricas sucesivas de 5 disoluciones independientes de androsterona $6.0 \mu\text{M}$ utilizando el mismo biosensor, obteniéndose una desviación estándar relativa, $\text{RSD} = 1.8\%$. La reproducibilidad del método se evaluó empleando cinco biosensores diferentes, que proporcionaron un valor de $\text{RSD} = 3.5\%$. Estos resultados ponen de manifiesto una excelente precisión de las medidas y demuestran la fiabilidad del método de fabricación del bioelectrodo.

Se estudió también el tiempo de vida útil del biosensor, realizando calibrados de androsterona en el intervalo de concentraciones comprendido entre 2.0 y $6.0 \mu\text{M}$ durante distintos días con un único dispositivo. En la Figura 36 se ha representado el

gráfico de control que muestra los valores de las pendientes de los calibrados obtenidos cada día. Los límites $\pm 3s$ corresponden a la desviación estándar del valor medio de la pendiente del calibrado ($n = 3$) obtenida el primer día de trabajo. Como puede observarse, probablemente como consecuencia del decaimiento paulatino de la actividad de la enzima adsorbida en la superficie del electrodo, dichos valores tienden a disminuir a partir del tercer día de trabajo. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos, puede decirse que no existen diferencias significativas entre las pendientes de los calibrados durante al menos seis días, sin que sea necesario aplicar ningún procedimiento de regeneración de la superficie del electrodo. Naturalmente, cuando la enzima se agota, es posible preparar un nuevo biosensor, sin más que pulir su superficie con un papel no abrasivo, y depositar una nueva cantidad de enzima fresca.

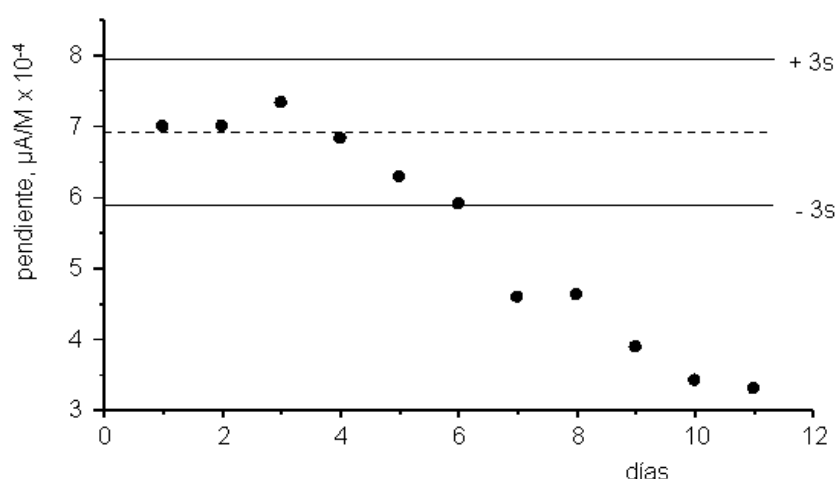


Figura 36.- Gráfico de control para la evaluación de la estabilidad del biosensor de androsterona.

Por último se estudió la estabilidad del material compósito, con el fin de descartar la pérdida física de NAD^+ desde la matriz del electrodo a la disolución. Para ello se utilizó un método espectrofotométrico basado en la medida de la absorbancia a 261 nm en medio regulador TRIS de pH 8.5. Primeramente se realizó un calibrado de patrones de NAD^+ en las condiciones experimentales indicadas y después se registraron cinco voltamperogramas cíclicos, en el margen de potencial de -0.1 y +0.1 V, del electrodo compósito MWCNTs/OPPF₆/ NAD^+ sumergido en una disolución del mismo regulador, midiéndose finalmente la absorbancia de la disolución resultante. La interpolación de dicho valor en el calibrado indicó que las pérdidas por disolución del

NAD⁺ confinado en la matriz electródica, aproximadamente del 4%, no son significativas en las condiciones experimentales seleccionadas.

5.1.2.4. Parámetros cinéticos

Para el cálculo de los parámetros cinéticos, en primer lugar se obtuvo una curva de saturación para androsterona registrando los correspondientes amperogramas en disolución agitada sobre el biosensor 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ para adiciones sucesivas de 50 μ L de una disolución patrón de la hormona de concentración 3.4×10^{-4} M (100 mg/L) a la célula de medida que contenía 10.0 mL de disolución reguladora TRIS de pH 8.5. A continuación se verificó que la reacción enzimática que tiene lugar obedece a una cinética del tipo Michaelis-Menten, aplicando la ecuación de Hill a los datos amperométricos obtenidos. La ecuación de Hill para un biosensor que obedece dicho comportamiento es:

$$\log \left[\left(\frac{i_{\text{máx}}}{i} \right) - 1 \right] = \log K_M^{\text{ap}} - x \log [S]$$

donde el coeficiente de Hill, x , que es un índice del grado de desviación de esta cinética, debe ser próximo a la unidad para un buen ajuste. En el caso del biosensor desarrollado, la representación de la ecuación anterior se muestra en la Figura 37, habiéndose obtenido un valor de $x = 0.99 \pm 0.08$, lo que indica el cumplimiento de una cinética de Michaelis-Menten prácticamente ideal [Wendzinski, 1997]. Una vez comprobado este comportamiento, se procedió al cálculo de los parámetros cinéticos K_M^{ap} y $V_{\text{máx}}$ por el método de Lineweaver-Burk, a partir de los datos de la curva de saturación anterior, mostrándose la gráfica obtenida en la Figura 38.

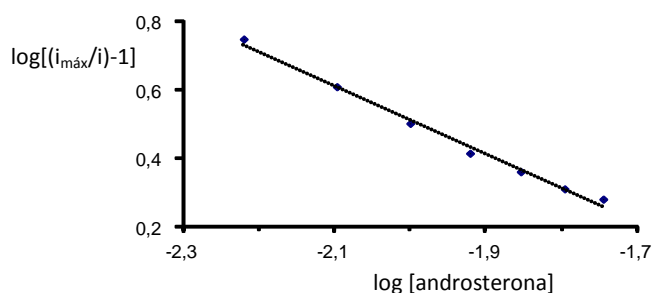


Figura 37.- Gráfico de Hill para adiciones sucesivas de androsterona.

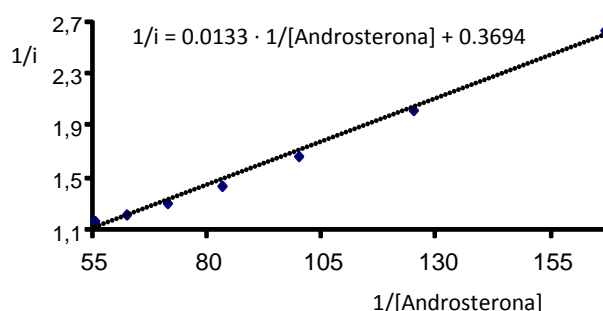


Figura 38.- Representación de Lineweaver-Burk para androsterona.

A partir de esta última representación se calculó el valor de $V_{máx}$, que corresponde a la actividad cuando toda la enzima está complejada con el sustrato, y la constante de Michaelis-Menten aparente, K_M^{ap} . Los valores experimentales obtenidos fueron $2.7 \mu A$ y $36.0 \mu M$. Desde el punto de vista analítico, cuánto más alta es la constante de Michaelis-Menten, K_M , menor es la sensibilidad del método, pero mayor es el intervalo de linealidad. En este caso, el valor obtenido, $36.0 \mu M$, es mucho menor que el dato encontrado en la bibliografía, $189 \mu M$, obtenido por inmovilización de la enzima 3α -HSD sobre un electrodo de carbono vitrificado y entrecruzamiento con glutaraldehído y BSA [Teodorczyk, 1990]. Esta diferencia concuerda con la mayor sensibilidad del biosensor diseñado en este trabajo. Por otro lado, la constante calculada es muy parecida a la de la enzima en disolución de pH 9.0, calculada mediante espectrofotometría UV-vis, $30 \pm 3 \mu M$ [Penning, 1984]. De este modo, el bajo valor de K_M^{ap} obtenido para dicho biosensor, pone de manifiesto la elevada afinidad de la enzima 3α -HSD por el sustrato en el microambiente proporcionado por la adsorción sobre el electrodo MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺, de modo contrario a lo que ocurre cuando se utiliza un electrodo de carbono vitrificado, en el que la enzima se encuentra en condiciones menos parecidas a su estado nativo.

5.1.2.5. Estudio de interferencias

La androsterona se determina normalmente en muestras de suero y orina, donde puede coexistir con otras hormonas y compuestos como los ácidos úrico y ascórbico. Debido a esto, para investigar la aplicabilidad del método desarrollado al

análisis de muestras reales, se estudió la influencia de la presencia de estos ácidos y de algunas hormonas relacionadas estructuralmente con la androsterona, sobre la respuesta del biosensor. Las hormonas estudiadas fueron testosterona, cortisol, 17β -estradiol (E2) y 19-nortestosterona (nandrolona). Las estructuras químicas de estos compuestos aparecen representadas en las Figuras 2, 5 y 19.

Para realizar este estudio se midió la intensidad de corriente del biosensor 3α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ en medio TRIS 0.1 M de pH 8.5 para diferentes adiciones de los compuestos estudiados a las concentraciones que cabe esperar a nivel fisiológico, observándose que únicamente los ácidos úrico y ascórbico presentaban señales de oxidación en las condiciones experimentales utilizadas. En la Figura 39 se han representado algunos de los amperogramas registrados. La presencia de estos compuestos a niveles de concentración comprendidos entre 1 y 10 μ M proporciona errores relativos en la determinación de androsterona 20 μ M del 3.8 % y el 3.7 %, respectivamente, para ácido úrico y ácido ascórbico.

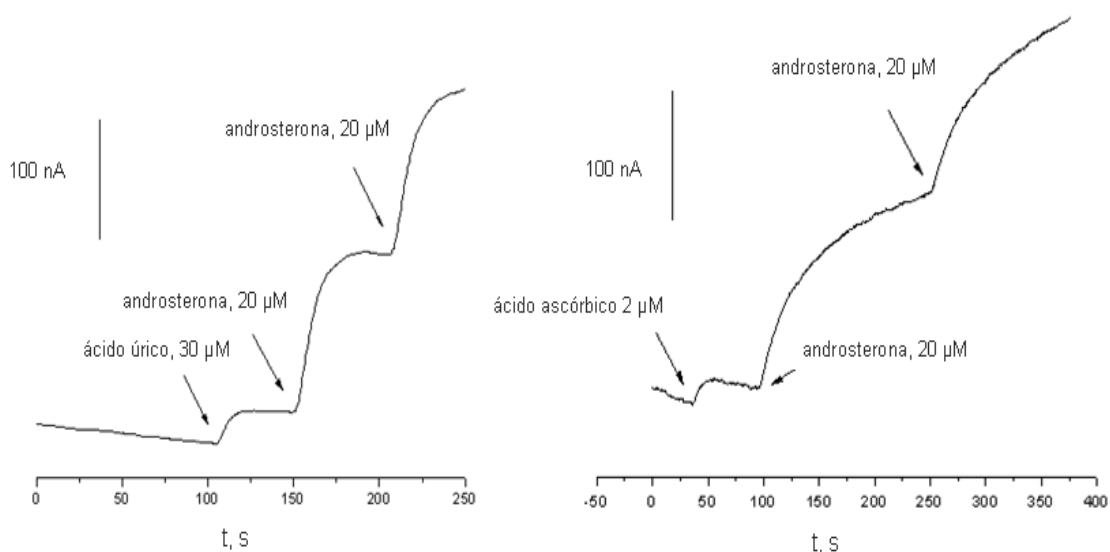


Figura 39.- Efecto de la presencia de ácido úrico y de ácido ascórbico sobre la determinación de androsterona con el biosensor 3α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺.

Se ha visto que el efecto producido por estos compuestos puede ser prácticamente evitado cuando el electrodo se recubre de una película de Nafión, ya que al pH alcalino de medida, los aniones formados por disociación de los ácidos son

rechazados sobre la superficie modificada con el ionómero. Sin embargo, en estas condiciones se produce una notable disminución de la pendiente del calibrado, por lo que se optó por no utilizar esta estrategia. Como se verá más adelante, en la aplicación del biosensor al análisis de muestras de suero, no se apreció ningún efecto sobre la determinación de androsterona por parte de los compuestos endógenos de la muestra.

Por otro lado, de todas las hormonas ensayadas, el 17β -estradiol fue el que produjo un mayor nivel de interferencia, dando lugar a un error relativo superior al 5% en la determinación de androsterona a partir de una relación interferente/analito de 0.05. Este resultado está de acuerdo con los datos publicados acerca de una débil actividad 17β -estradiol deshidrogenasa por parte de la enzima 3α -HSD [Battais, 1977]. Finalmente, el cortisol y la 19-nortestosterona, ambos en concentraciones diez veces más altas que las de su nivel fisiológico, y la testosterona, a una concentración 1000 veces superior a dicho nivel, no producen ningún efecto apreciable sobre la respuesta del biosensor a la androsterona.

5.1.2.6. Aplicación a la determinación de androsterona en suero humano

La utilidad del biosensor desarrollado se evaluó por aplicación del procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo 4.7.4.1.) al análisis de muestras de suero humano enriquecidas con androsterona a un nivel de concentración de $1.25\ \mu\text{M}$ ($0.36\ \mu\text{g/mL}$). Primero se comprobó la ausencia de respuesta amperométrica del suero sin contaminar al potencial de detección aplicado, 400 mV, demostrándose así que este no contenía androsterona ni compuestos endógenos interferentes. Después se investigó la existencia de efecto matriz en el suero contaminado, calculando las pendientes de varios calibrados de adiciones patrón, obteniéndose un valor medio de $68 \pm 9\ \mu\text{A/mM}$. Este resultado es ligeramente menor que el obtenido para el calibrado de patrones de androsterona ($70 \pm 2\ \mu\text{A/mM}$), no obstante, se empleó el método de adiciones estándar para la determinación de la hormona en las muestras. Los porcentajes de recuperación media de androsterona ($n = 5$) se situaron entre 97.2 y 103 %, con una desviación estándar relativa del 2.7 %. Estos resultados demuestran la

utilidad práctica del biosensor para el análisis rápido de androsterona en suero humano, confirmándose la validez de la aproximación metodológica.

5.1.2.7. Conclusiones

La adición del cofactor NAD^+ a la mezcla compósita de nanotubos de carbono y el líquido iónico OPPF₆, ha permitido construir un biosensor amperométrico para la determinación de androsterona por inmovilización de la enzima 3 α -HSD. Las características analíticas del biosensor son adecuadas para su aplicación al análisis de muestras de suero humano. Además, la versatilidad de la configuración desarrollada permitirá, probablemente, extrapolar el diseño a la preparación de otros biosensores basados en enzimas del tipo de las deshidrogenasas.

**5.1.3. BIOSENSOR PARA ANDROSTERONA BASADO EN UN
ELECTRODO COMPÓSITO DE TAMAÑO MICROMÉTRICO DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO, NANOTUBOS DE CARBONO Y
LÍQUIDO IÓNICO**

En el análisis de fluidos biológicos para la determinación de hormonas, muchas veces se dispone de un volumen de muestra escaso, que hace prácticamente imposible la obtención de alícuotas para la realización de medidas repetidas y el control estadístico del método. En estos casos, no solo es necesario aplicar técnicas analíticas capaces de proporcionar respuestas de alta sensibilidad en presencia de una baja concentración de analito sino que, además, estas técnicas deben ser capaces de medir físicamente en la pequeña cantidad de muestra en la que se encuentra el analito. Como se ha señalado a lo largo de la memoria, una de las ventajas de las técnicas electroquímicas es que se adaptan perfectamente a la miniaturización. Por un lado, la señal electroquímica se genera en la superficie del electrodo y no depende del tamaño del recipiente o del volumen de disolución que se mida y, por otro, la reducción del tamaño de los electrodos, no solo no empeora las características de la medida, sino que, como es sabido, proporciona, a partir de un cierto nivel a escala micrométrica, una mayor densidad de corriente.

En esta parte del trabajo se desarrolló un electrodo compuesto de tamaño micrométrico basado en un material híbrido de nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y el líquido iónico OPPF₆ con el fin de utilizarlo para la determinación de androsterona en pequeños volúmenes de suero, mediante la incorporación de la enzima 3 α -HSD a la matriz del electrodo y la medida en presencia de NAD⁺.

5.1.3.1. Configuración del biosensor

En la Parte Experimental (Apdo. 4.7.1.3.) se ha descrito el procedimiento para la fabricación del electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ que se ha representado de forma simplificada en la Figura 40A. El material compuesto se prepara por mezcla de los tres componentes y, una vez homogeneizado, se introduce a presión una porción del mismo en la carcasa de metacrilato. Para la preparación del biosensor 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆, el material biocompuesto se fabrica añadiendo la enzima a la mezcla anterior de tres componentes, homogeneizando igualmente. Como puede apreciarse en la Figura 40B, la determinación de androsterona se realiza del mismo modo que en el capítulo anterior, si bien ahora la enzima forma parte de la matriz del electrodo y el cofactor NAD⁺ se encuentra en disolución.

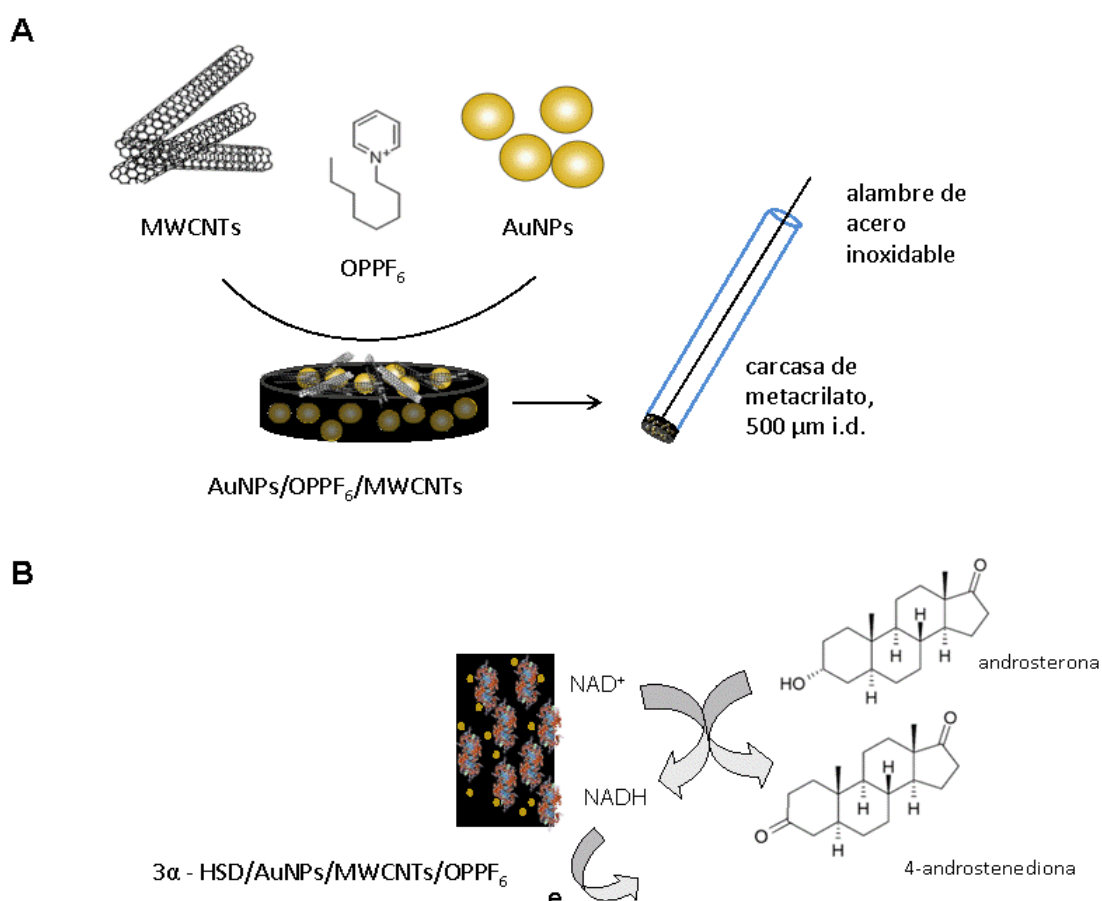


Figura 40.- A) Esquema de la preparación del electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ y B) funcionamiento del biosensor 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆.

5.1.3.2. Optimización de las variables experimentales

Al igual que en el capítulo anterior, se han tenido en cuenta los parámetros optimizados anteriormente relacionados con la fabricación del material compuesto AuNPs/MWCNTs/OPPF₆, de manera que aquí se estudian las variables que afectan a la construcción del biosensor electroquímico por atrapamiento de la enzima 3 α -HSD y a la determinación de androsterona basada en la detección de NADH en presencia del cofactor NAD⁺ en disolución.

Elección del potencial de medida

En la Figura 28 del capítulo 5.1. se comparaban los voltamperogramas cíclicos del NADH sobre los electrodos compósitos MWCNTs/OPPF₆ y AuNPs/MWCNTs/OPPF₆, observándose la obtención de una mayor cantidad de corriente a potenciales ligeramente inferiores cuando se emplean estos últimos electrodos. Este resultado llevó a elegir un potencial de detección de 300 mV para la determinación de androsterona utilizando el biosensor de tamaño micrométrico basado en dicho material. Para esta elección, al igual que en ocasiones anteriores, se optó por el valor de potencial que presentaba una mayor relación señal/ruido. La pendiente del calibrado de NADH obtenido en estas condiciones, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.1×10^{-4} y 1.4×10^{-4} M en medio regulador fosfato 0.1 M de pH 7.4, fue de 3.5 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Este resultado es aproximadamente un orden de magnitud menor al obtenido anteriormente con el electrodo MWCNTs/OPPF₆. Aunque el potencial aplicado en este caso y el material del electrodo son distintos, se considera que la diferencia de pendientes encontrada se debe principalmente a la diferencia existente entre las áreas geométricas de ambos electrodos: $7.1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ para el convencional y $1.96 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ para el de tamaño micrométrico. Cuando se calcula la pendiente por unidad de área para cada electrodo, se obtienen los valores de 459 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ y 1786 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$, respectivamente. Estos valores ponen de manifiesto un mejor comportamiento del electrodo de área menor, que es el que proporciona una mayor densidad de corriente y, por tanto, una mayor sensibilidad relativa cuando se compara con el de tamaño convencional. Aunque el tamaño de este electrodo es algo elevado como para considerarlo un verdadero microelectrodo (dimensión crítica,

$r \leq 100 \mu\text{m}$), el hecho de que proporcione una densidad de corriente más alta, revela un comportamiento similar.

Influencia de la cantidad de enzima

Una de las mayores ventajas de los electrodos compósitos es la posibilidad de incorporar las biomoléculas a la matriz del electrodo para la preparación de biosensores. En esta configuración, el biosensor $3\alpha\text{-HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF}_6$ se preparó por inclusión física de la enzima $3\alpha\text{-HSD}$ en la pasta formada por los tres componentes, AuNPs, MWCNTs y OPPF_6 , del modo que se describe en el Apdo. 4.7.1.4. de la Parte Experimental. Con el fin de optimizar la cantidad de enzima, se estudió el comportamiento de diferentes biosensores de tamaño micrométrico preparados con 0, 0.05, 0.1 y 0.2 unidades de $3\alpha\text{-HSD}$ por 5 mg de pasta, con los que se midieron las respuestas de la corriente medida a 300mV de disoluciones de $1 \mu\text{g/mL}$ de androsterona en presencia de NAD^+ 50 mM. En la Figura 41 se han representado los resultados obtenidos, encontrándose la mejor relación señal/ruido con el biosensor preparado con 0.05 unidades de enzima por 5 mg de pasta.

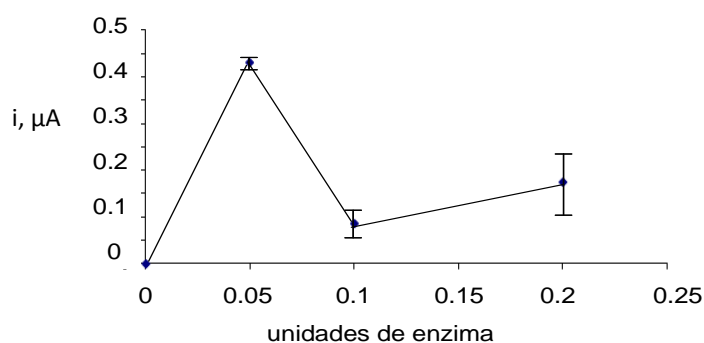


Figura 41.- Influencia de la cantidad de enzima.

Probablemente, la disminución de las respuestas observada para mayores cantidades de enzima se debe a la menor conductividad de la pasta en presencia de un exceso del material biológico aislante. Por ello, se seleccionó dicha proporción para estudios posteriores.

Influencia de la concentración de NAD⁺

La concentración del cofactor NAD⁺ también se optimizó, realizando medidas amperométricas de disoluciones de androsterona de 1 µg/mL, que contenían además NAD⁺ en concentraciones comprendidas entre 25 y 500 mM. Como puede observarse en la Figura 42, la intensidad de corriente aumenta con la concentración de cofactor hasta un valor de 50 mM, permaneciendo prácticamente constante para concentraciones superiores. Como es sabido, una concentración excesiva de NAD⁺ puede originar un efecto inhibitor sobre la respuesta de los biosensores de deshidrogenasas [Chakraborty, 2007]. Por ello, se eligió la concentración indicada para llevar a cabo la determinación de androsterona.

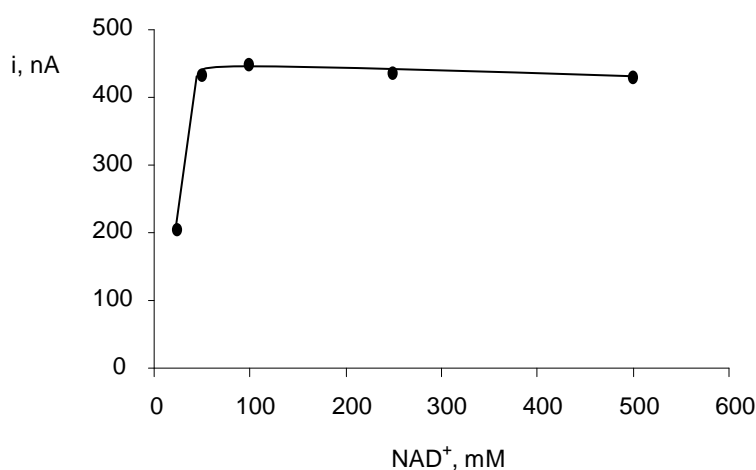


Figura 42.- Influencia de la concentración de NAD⁺.

5.1.3.3. Calibrado y características analíticas

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas previamente, se obtuvo un calibrado de androsterona con el biosensor 3α-HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ de tamaño micrométrico. Se observó un intervalo lineal ($r = 0.993$) entre 0.1 y 120 µg/mL (0.34 – 413 µM) con una pendiente de 7.8 ± 0.4 nA mL/µg (2.2 ± 0.1 µA/mM) (Figura 43). Esta pendiente es mucho menor que la obtenida anteriormente con el biosensor 3α-HSD/MWCNTs/OPPF₆ de tamaño convencional, empleando un potencial de detección de 400 mV, pero es más de siete veces mayor que la obtenida usando un electrodo de carbono vitrificado modificado con 3α-HSD y entrecruzado con glutaraldehído [Teodorczyk, 1990], a pesar de utilizar un potencial de 600 mV. Por otro

lado, el intervalo recto del calibrado se extiende hasta concentraciones del orden de 40 veces más altas cuando se utiliza el biosensor de menor tamaño.

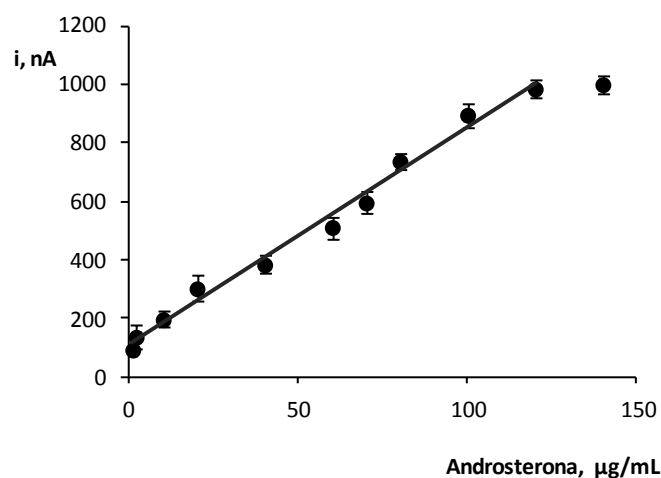


Figura 43.- Calibrado para androsterona sobre el biosensor $3\alpha\text{-HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF}_6/\text{NAD}^+$ de tamaño micrométrico.

El límite de detección, $0.09 \mu\text{g/mL}$ ($0.31 \mu\text{M}$), se calculó aplicando el criterio $3s_b/m$, donde la m es la pendiente de la región lineal del calibrado, y s_b es una estimación de la desviación estándar del blanco, obtenida por medida repetida ($n = 10$) de las señales amperométricas correspondientes a la concentración más baja medible del calibrado, $0.1 \mu\text{g/mL}$.

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La alta estabilidad de los biosensores basados en el atrapamiento de enzimas en la matriz de los electrodos compósitos es una ventaja inherente a estas configuraciones. Otra característica a destacar es la posibilidad de renovar la superficie del electrodo cuando se produce un decrecimiento de la respuesta del biosensor, mediante simple pulido, obteniendo así una nueva superficie con enzima fresca lista para continuar las medidas. En este apartado se estudiaron diferentes aspectos relacionados con la estabilidad del biosensor $3\alpha\text{-HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF}_6$ de tamaño micrométrico. En primer lugar, se realizaron medidas amperométricas sucesivas de disoluciones de androsterona de 0.1 y $10 \mu\text{g/mL}$ empleando un único microsensor cuya superficie se pulía con un papel no abrasivo entre medidas. Los

valores de RSD obtenidos fueron 5.8 y 6.8 % ($n = 5$), respectivamente. Estos resultados demuestran una buena precisión de las medidas y del procedimiento de limpieza del electrodo, a pesar de su pequeño tamaño. Por otro lado, se evaluó la reproducibilidad de las medidas obtenidas con cinco biosensores diferentes para las mismas concentraciones de androsterona. Estas medidas se realizaron en diferentes días, obteniéndose valores de RSD de 7.1 y 6.4 %, respectivamente. Estos resultados demuestran la buena precisión del procedimiento de fabricación del biosensor de tamaño micrométrico.

Finalmente se estudió el tiempo de vida útil del material compósito 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ con el fin de investigar la estabilidad de la enzima en el microambiente proporcionado por los nanomateriales, principalmente las nanopartículas de oro por su gran afinidad con las biomoléculas, y el líquido iónico. Se observó que cuando la mezcla se conserva en nevera, a 4 °C, es posible utilizarla durante al menos diecinueve días sin que tenga lugar ninguna variación apreciable en las respuestas amperométricas realizadas con el biosensor micrométrico. Como dato a tener en cuenta para apreciar la estabilidad de la enzima en estas condiciones, indicar que el valor de RSD obtenido para una serie de primeras medidas realizadas con biosensores preparados con la misma pasta ($n = 8$) a lo largo de este intervalo de tiempo, fue del 8.9 %. Se considera que este es un buen resultado, teniendo en cuenta que en él, no solo se pone de manifiesto la estabilidad de la enzima, sino también la reproducibilidad del método de preparación de los electrodos, y demuestra que es posible preparar con una buena precisión un número elevado de biosensores de tamaño micrométrico a partir de una única mezcla biocompósita, cuando esta se conserva en las condiciones indicadas.

5.1.3.4. Parámetros cinéticos

De forma similar a lo observado con el biosensor compósito anterior, se comprobó que la reacción enzimática sobre el biosensor 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ se ajustaba bien a una cinética de Michaelis–Menten, tal como demuestra el valor del parámetro “ x ”, 0.98 ± 0.06 , muy próximo a la unidad,

calculado a partir de la gráfica de Hill. La constante aparente de Michaelis–Menten, obtenida a partir de la representación de Lineweaver–Burk, fue en este caso, $K_M^{ap} = 173 \mu\text{M}$. Este valor es ligeramente inferior, aunque del mismo orden de magnitud, que el calculado para el biosensor de androsterona preparado por adsorción de la enzima $3\alpha\text{-HSD}$ sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado y entrecruzamiento con glutaraldehído, $189 \mu\text{M}$ [Teodorczyk, 1990], pero muy superior al obtenido para el biosensor preparado por adsorción de la enzima sobre la superficie del electrodo $3\alpha\text{-HSD/MWCNTs/OPPF}_6/\text{NAD}^+$, $36 \mu\text{M}$. La diferencia encontrada entre las constantes obtenidas con ambos electrodos compósitos, se debe probablemente a la distinta forma utilizada para la inmovilización de la enzima, y parece demostrar que esta se desenvuelve en un microambiente de menor rigidez y más parecido a su medio natural cuando se adsorbe sobre la superficie del electrodo compósito, que cuando se atrapa por incorporación física a la pasta electródica.

5.1.3.5. Aplicación a la determinación de androsterona en suero humano

La utilidad del biosensor micrométrico para el análisis de muestras reales se demostró por aplicación a una muestra de suero humano enriquecido con androsterona a un nivel de concentración de 250 ng/mL . Al igual que se hizo con el biosensor anterior, primero se comprobó la ausencia de respuesta amperométrica del suero sin contaminar al potencial de detección de 300 mV , demostrándose igualmente que este no contenía especies electroactivas a dicho valor de potencial. A continuación se estudió la existencia de efecto matriz en el suero contaminado, obteniendo la pendiente del calibrado de adiciones patrón, cuyo valor, $7.7 \pm 0.3 \text{ nA mL}/\mu\text{g}$, es estadísticamente comparable al de patrones de androsterona, $7.8 \pm 0.4 \text{ nA mL}/\mu\text{g}$. Esto significa que es posible llevar a cabo la determinación de la hormona por interpolación de la respuesta del biosensor en dicho calibrado. La aplicación del procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.7.4.2.) a cinco muestras de suero contaminado proporcionó una concentración media de $248 \pm 10 \text{ ng/mL}$, con recuperaciones comprendidas entre 95 y 104 %. Estos resultados demuestran la utilidad analítica del biosensor desarrollado.

5.1.3.6. Conclusiones

El electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ de dimensión micrométrica, por una parte conserva las propiedades mejoradas del material híbrido, como consecuencia del efecto sinérgico debido a la presencia de los distintos componentes y, por otra, debido a su pequeña superficie activa, mejora la velocidad de transferencia de masa y disminuye la corriente de fondo, dando lugar a un aumento de la relación señal/ruido. Por último, su tamaño micrométrico permite la realización de las medidas electroquímicas en pequeños volúmenes de muestra (500 μ L), sin cambios significativos en las características analíticas del biosensor, lo cual puede resultar de gran utilidad en el análisis de muestras biológicas.

5.2. INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN MICROPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS

Como se ha señalado en el capítulo de Antecedentes (Apdo. 3.1.2.), las micropartículas magnéticas (MBs) constituyen actualmente una herramienta muy útil y versátil para la preparación de inmunosensores electroquímicos. Las características de estas micropartículas han sido descritas anteriormente, debiéndose resaltar aquí que su uso permite la inmovilización de una alta concentración de biomoléculas al tiempo que facilita la aplicación precisa de las etapas de preparación del inmunosensor.

En los trabajos que se presentan a continuación se utilizaron micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Strept-MBs) y con proteína A (protein A-MBs) para la puesta a punto de dos magnetoinmunosensores electroquímicos para la determinación de prolactina y de cortisol, respectivamente. Las características de las interacciones de ambas funciones con los anticuerpos han sido comentadas previamente, así como también las propiedades de las hormonas consideradas en este capítulo y los métodos anteriores utilizados para su monitorización.

Como se verá, las configuraciones desarrolladas están basadas en formatos de tipo sándwich (prolactina) y competitivo (cortisol), empleando en ambos casos fosfatasa alcalina como enzima de marcaje y 1-naftilfosfato como sustrato enzimático. La detección electroquímica del 1-naftol formado se realizó sobre electrodos serigrafiados de carbono mediante voltamperometría diferencial de impulsos, así como también, en el caso del cortisol, empleando un electrodo compuesto nanoestructurado de tamaño micrométrico. Las características analíticas de los métodos puestos a punto fueron, en ambos casos, apropiadas para la determinación de estas hormonas en muestras de suero humano. Además, el electrodo compuesto nanoestructurado se empleó también para la determinación de cortisol en muestras de orina.

**5.2.1. INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA
PROLACTINA BASADO EN MICROPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS CON ESTREPTAVIDINA**

Como se ha mencionado, la determinación de prolactina es importante para estudiar los trastornos menstruales de las mujeres, así como otras enfermedades como la galactorrea, el hipogonadismo y la infertilidad. Los niveles muy elevados de esta hormona pueden ser, además, indicativos de la presencia de un prolactinoma. En el capítulo de Antecedentes (Apdo. 3.2.2.) se han comentado los métodos utilizados habitualmente para realizar la monitorización de prolactina en muestras biológicas, incluyendo los “kits” de inmunoensayo que se emplean mayoritariamente en los laboratorios de análisis clínicos. Como también se ha señalado, en el momento en que se realizó esta investigación, únicamente se había descrito en la bibliografía un inmunosensor fluorimétrico para la determinación de prolactina en suero humano [Petrou, 2002]. Teniendo estos datos en cuenta, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo del primer inmunosensor electroquímico para la determinación de prolactina, con el fin de aprovechar características tales como la mayor sensibilidad, reproducibilidad, simplicidad de fabricación y de uso de estos dispositivos, en combinación con las ventajas ya citadas de las micropartículas magnéticas y de los electrodos serigrafiados.

5.2.1.1. Configuración del inmunosensor

En la Figura 44 se ha representado un esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor. Como puede observarse, el procedimiento, descrito minuciosamente en la Parte Experimental (Apdo. 4.7.2.1.), consiste en la inmovilización del anticuerpo de captura, anti-prolactina biotinilada (anti-PRL-Biotin), sobre la superficie de las micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Strept-MBs). Seguidamente se incorpora el antígeno (prolactina, PRL) y el anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (AP), AP-anti-PRL. Para la determinación, el magnetoinmunoconjugado resultante, AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs, se inmoviliza sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE) con ayuda de un pequeño imán, se añade 1-naftilfosfato (1-NPP) y se registra la respuesta de oxidación del producto de la reacción enzimática, el 1-naftol (1-NP).

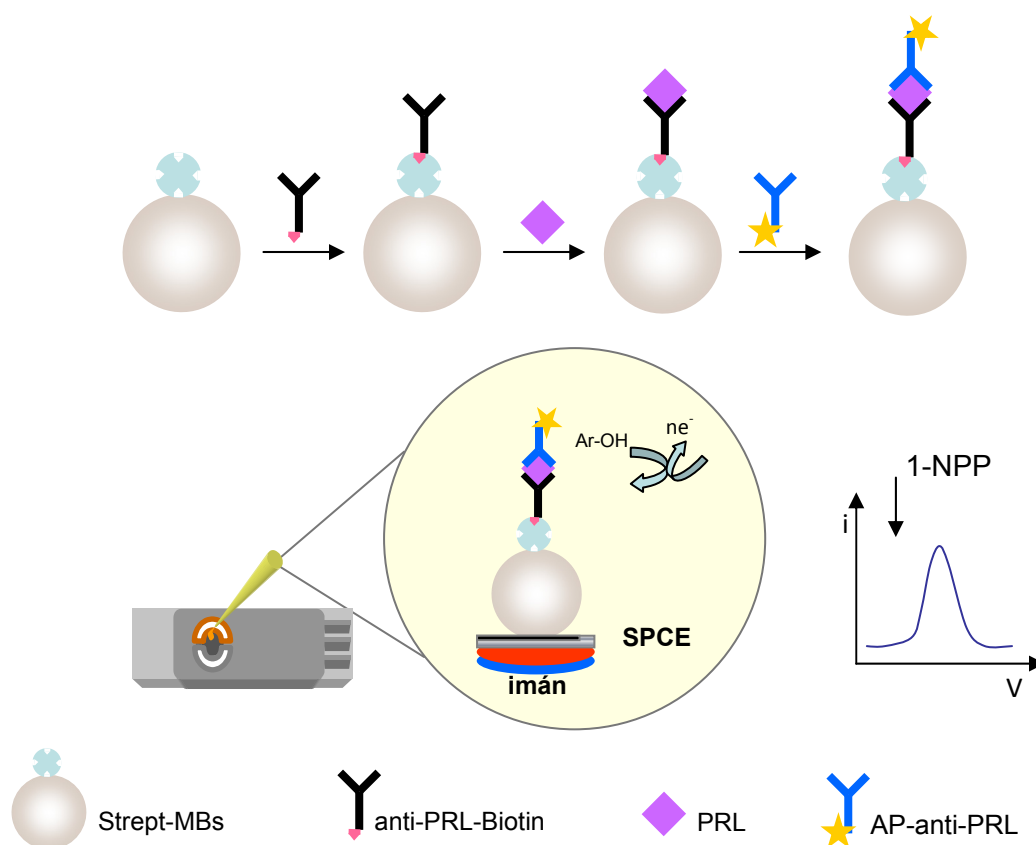


Figura 44.- Esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor.

5.2.1.2. Optimización de las variables experimentales

Con el objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad y el intervalo de linealidad más amplio para la determinación de prolactina, se optimizaron todas las variables implicadas en la preparación y el funcionamiento del inmunosensor, con los resultados que se describen a continuación.

Elección del sustrato de la enzima fosfatasa alcalina

Para llevar a cabo la determinación de analitos empleando inmunosensores electroquímicos con marcadores enzimáticos, es necesario elegir el sustrato de la enzima más apropiado, teniendo en cuenta las características de la respuesta electroquímica del producto de la reacción enzimática sobre el electrodo que se vaya a utilizar como plataforma sensora. Dicha elección deberá realizarse con el criterio de alcanzar la mayor sensibilidad de la detección y la mejor selectividad, de modo que sea posible utilizar el dispositivo en el análisis de muestras reales diluidas y complejas.

Como es sabido, la enzima fosfatasa alcalina cataliza la desfosforilación hidrolítica a pH básico de los arilfosfatos, produciendo fenoles. Por ello, en este caso, para seleccionar el mejor sustrato, se investigó la respuesta de oxidación de diferentes derivados fenólicos con buenas características electroquímicas, fenol, 1-naftol y p-nitrofenol, que corresponden, además, a productos que pueden ser generados a través de la reacción enzimática. Se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs) por ser esta la plataforma empleada para la preparación del magnetoinmunosensor, así como la técnica de voltamperometría cíclica. Los resultados que se muestran en la Figura 45 ponen de manifiesto que en las condiciones experimentales utilizadas, todos los compuestos fenólicos presentan un pico de oxidación irreversible bien definido. De ellos, el pico del 1-naftol es el de intensidad más baja, pero también es el que aparece a un potencial significativamente menos positivo que el de los otros compuestos. Debido a esto y como solución de compromiso entre una mayor sensibilidad y una mejor selectividad, se eligió 1-naftilfosfato (1-NPP) como sustrato enzimático.

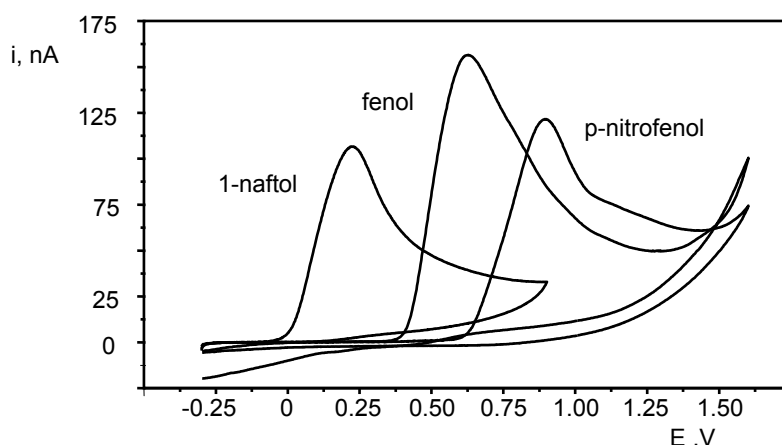


Figura 45.- Voltamperogramas cíclicos de 1-naftol, fenol y p-nitrofenol 5.0 mM sobre SPCEs; regulador Trizma 0.1 M de pH 9.0; $v = 50$ mV/s.

Influencia de la cantidad de micropartículas magnéticas funcionalizadas

En primer lugar se prepararon diferentes inmunosensores aplicando el procedimiento descrito en el Apdo. 4.7.2.1. de la Parte Experimental, utilizando diferentes cantidades de micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina. Se estudiaron volúmenes de la suspensión de Strept-MBs comprendidos entre 1 y 5 μL , que corresponden a cantidades de 10 a 50 μg de partículas. Además, se emplearon 50 μL de anti-PRL-Biotin de 4.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 μL de PRL de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y una dilución de 1:100 del anticuerpo marcado con AP. En la Figura 46 se muestra la dependencia encontrada para la señal voltamperométrica en función de esta variable. Como puede observarse, la corriente aumenta hasta llegar a un volumen de 2 μL (20 μg), debido a que se incrementa también la cantidad de anticuerpo marcado sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, para cantidades superiores se observa una disminución de la señal, probablemente debido a que en estas condiciones toda la anti-prolactina ensayada ha quedado inmovilizada sobre las MBs, con lo que el exceso de partículas magnéticas supone un impedimento físico a la transferencia de electrones.

Estos resultados llevaron a elegir un volumen de suspensión de micropartículas magnéticas de 2 μL , es decir, una cantidad de 20 μg para estudios posteriores.

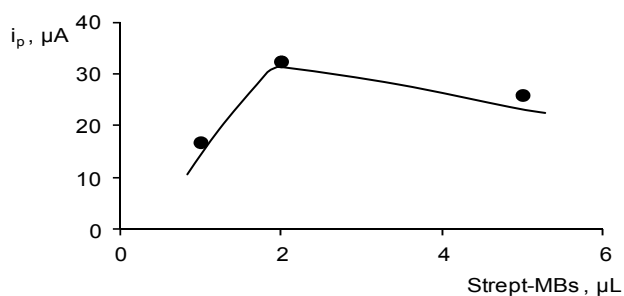


Figura 46.- Influencia del volumen de suspensión de Strept-MBs.

Influencia de la concentración y el tiempo de incubación del anticuerpo anti-prolactina biotinilado

La cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas desempeña un papel clave en la preparación del inmunosensor, ya que influye decisivamente en las características analíticas del método, principalmente en relación con la sensibilidad y el intervalo lineal alcanzables. Con el fin de optimizar esta variable, se estudiaron las respuestas obtenidas por inmovilización de 50 μL de una disolución de anti-PRL-Biotin en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 37 $\mu\text{g/mL}$, empleando un exceso de prolactina (1 $\mu\text{g/mL}$) y del anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (dilución 1:100), con el fin de asegurar que toda la prolactina enlazada específicamente al anticuerpo biotinilado está a su vez unida al anticuerpo anti-PRL-AP.

Como puede observarse en la Figura 47, para las concentraciones menores de anti-PRL-Biotin, la corriente de oxidación del 1-naftol aumenta con dicha concentración, alcanzándose un máximo de señal para 17.5 $\mu\text{g/mL}$. A partir de este valor, la señal decrece, lo que puede deberse a que se ha sobrepasado el punto de saturación de las micropartículas magnéticas, y concentraciones más elevadas del anticuerpo de captura dificultan la unión posterior de la prolactina y del anticuerpo marcado.

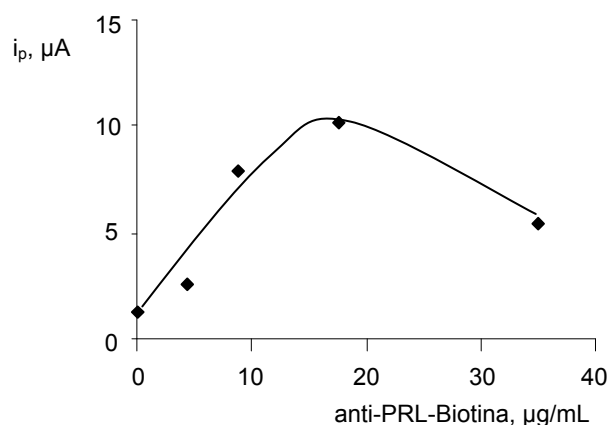


Figura 47.- Influencia de la concentración del anticuerpo anti-PRL-Biotin.

También se optimizó el tiempo de incubación del anticuerpo anti-PRL-Biotin sobre las micropartículas magnéticas funcionalizadas, estudiándose la influencia de dicha variable, en el intervalo de 15 a 60 minutos, sobre la respuesta de oxidación del 1-naftol. Para ello se prepararon inmunosensores en las mismas condiciones anteriores, con 17.5 $\mu\text{g/mL}$ de anti-PRL-Biotin. En la Figura 48 se muestran los resultados obtenidos, observándose el aumento de la corriente durante los 45 primeros minutos, y su disminución posterior, para tiempos de incubación más largos. Esta tendencia indica que un periodo de incubación de 45 min es suficiente para que se produzca la unión de toda la cantidad de anti-PRL-Biotin utilizada con las funciones estreptavidina de las micropartículas magnéticas, por lo que dicho valor fue el utilizado para los estudios siguientes.

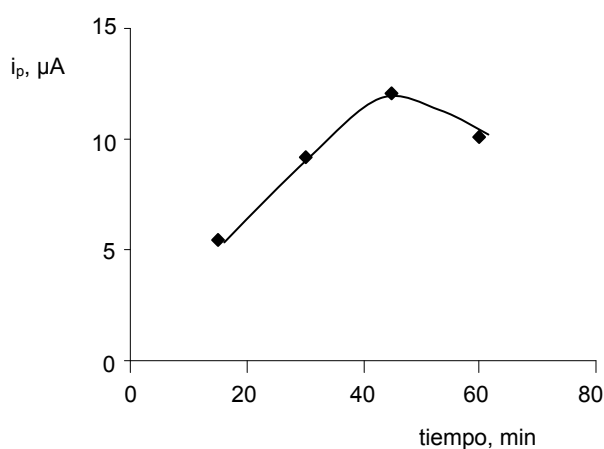


Figura 48.- Influencia del tiempo de incubación de anti-PRL-Biotin.

Influencia del tiempo de incubación de prolactina

El tiempo de contacto del antígeno con el anticuerpo de captura debe optimizarse cuidadosamente con el fin de alcanzar las condiciones óptimas para que tenga lugar la formación del inmunocomplejo. En este caso se estudió la influencia del tiempo de incubación del inmunoconjugado anti-PRL-Biotin-Strept-MBs en la disolución de prolactina, en el intervalo de 0 a 60 minutos, sobre la respuesta de oxidación del 1-naftol, empleando inmunosensores preparados con 50 μL de disolución de anti-PRL-Biotin de concentración 17.5 $\mu\text{g/mL}$, 50 μL de prolactina de 1000 ng/mL y una dilución 1:100 del anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina. Como se observa en la Figura 49, la respuesta de corriente aumenta rápidamente con el tiempo hasta alcanzar un máximo a 30 minutos, estabilizándose posteriormente y disminuyendo después ligeramente para tiempos superiores a 45 minutos. Estos resultados indican que probablemente todos los parátomos de los anticuerpos inmovilizados han sido ocupados empleando un tiempo de incubación de 30 minutos. Por ello, y con el fin de disminuir en lo posible el tiempo de análisis, se eligió este valor para posteriores estudios.

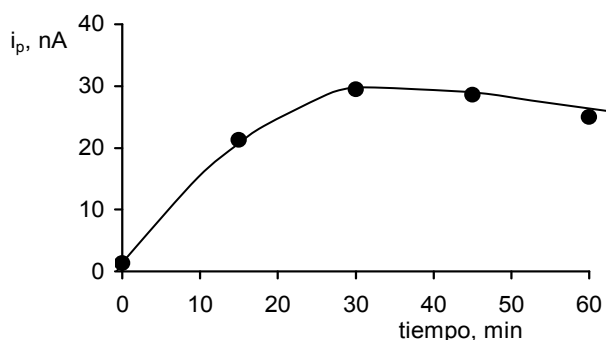


Figura 49.- Influencia del tiempo de incubación del inmunoconjugado anti-PRL-Biotin-Strept-MBs en la disolución de prolactina.

Influencia de la dilución y el tiempo de incubación del anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina

Con el fin de optimizar la concentración del anticuerpo AP-anti-PRL, se estudió la respuesta electroquímica de distintos inmunosensores preparados con diferentes diluciones del mismo en el intervalo comprendido entre 1:1000 y 1:100. Empleando las condiciones experimentales seleccionadas anteriormente, se observó un ligero aumento de la señal de oxidación del 1-naftol con la concentración del anticuerpo marcado hasta una dilución 1:500. Para concentraciones superiores, la señal se estabilizaba, lo que sugiere que la prolactina presente en el inmunosensor se encuentra saturada del anticuerpo marcado a dicha dilución. Por ello, con el fin de alcanzar una buena sensibilidad, así como de minimizar el consumo de reactivos, se escogió una dilución de anti-prolactina marcada de 1:500. Por otro lado, de forma análoga a lo comentado anteriormente, el tiempo de incubación del inmunoconjugado PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs en la disolución del anticuerpo marcado AP-anti-PRL ha de ser el suficiente para que tenga lugar la unión con las moléculas de prolactina presentes. Estudios realizados variando el tiempo de incubación en la disolución del anticuerpo marcado en el intervalo comprendido entre 15 y 60 min, permitieron seleccionar un tiempo óptimo de 30 minutos para esta etapa.

Influencia de la concentración de sustrato enzimático y del tiempo de hidrólisis

Como se ha visto anteriormente, el sustrato de la fosfatasa alcalina elegido fue el 1-naftilfosfato. Debido a que la enzima muestra su actividad óptima a pH 9 [Ito, 2000], se utilizó el regulador de pH Trizma 0.1 M y 1 mM en MgCl_2 de pH 9.0 para dicha reacción. Por otro lado, se optimizó la concentración de dicho compuesto estudiando la influencia de esta variable entre 5×10^{-5} y 0.1 M, sobre la respuesta del inmunosensor. Los resultados representados en la Figura 50 muestran un incremento rápido de la señal de oxidación de 1-naftol a medida que aumenta la concentración de 1-NPP hasta 5×10^{-3} M. Sin embargo, para concentraciones superiores se observa una disminución de la corriente, debido probablemente al ensuciamiento del electrodo por

parte de los productos generados en la oxidación electroquímica. De acuerdo con estos resultados, se eligió una concentración de 1-naftilfosfato 5×10^{-3} M, valor que asegura que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de la enzima.

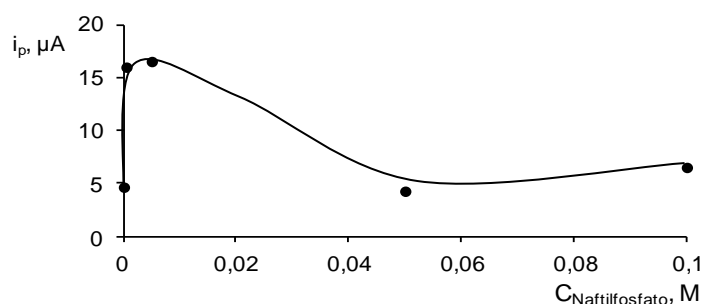


Figura 50.- Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato.

Utilizando las mismas condiciones experimentales, se optimizó también el tiempo durante el que se mantiene el inmunosensor para que se produzca la reacción de hidrólisis enzimática antes de efectuar la medida. Los resultados, representados en la Figura 51, muestran un aumento de la corriente de oxidación con el tiempo, siendo prácticamente constante para valores superiores a 8 minutos. Estos resultados llevaron a escoger este valor para realizar los estudios posteriores.

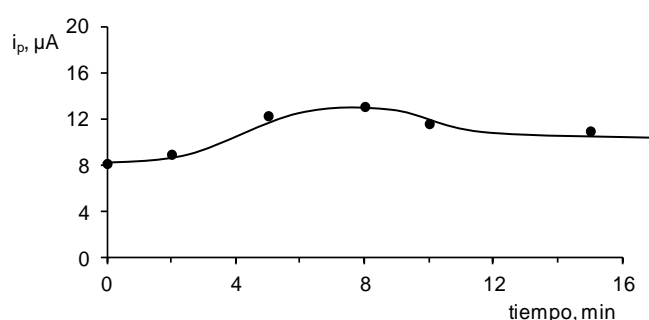


Figura 51.- Influencia del tiempo de hidrólisis.

A modo de resumen, se recogen en la Tabla 6 las variables estudiadas y los valores seleccionados en cada caso para la preparación del inmunosensor.

Tabla 6.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs/ SPCE para la determinación de prolactina.

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Volumen de suspensión de Strept-MBs, μL	1-5	2
anti-PRL-Biotin, $\mu\text{g/mL}$	0-37	17.5
Tiempo de incubación de anti-PRL-Biotin, min	0-60	45
Tiempo de incubación Prolactina, min	0-60	30
AP-anti-PRL, dilución	1:100-1:1000	1:500
Tiempo de incubación de AP-anti-PRL, min	0-60	30
1-NPP, M	5×10^{-5} -0.1	5×10^{-3}
Tiempo de hidrólisis, min	0-15	8

5.2.1.3. Calibrado y características analíticas

Empleando las condiciones experimentales previamente optimizadas, se construyó un calibrado para prolactina en el intervalo comprendido entre 10 y 3000 ng/mL. Como puede observarse en la Figura 52, la curva presenta el hábito típico de los inmunosensores basados en un formato tipo sándwich, observándose un aumento de la señal de oxidación de 1-naftol a medida que se incrementa la concentración de la hormona.

Dentro del intervalo de concentraciones estudiado, el margen de linealidad abarca entre 10 y 2000 ng/mL ($r = 0.993$) de prolactina, que es adecuado para la determinación de esta hormona en muestras clínicas. Por otra parte, este intervalo lineal es más amplio que el del único inmunosensor descrito la bibliografía, basado en detección fluorimétrica [Petrou, 2002], que se extiende tan solo entre 10 y aproximadamente 100 ng/mL de prolactina. La pendiente de la porción lineal del calibrado fue de 7.0 nA mL/ng. El límite de detección se calculó a partir de la expresión $\text{LOD} = 3s_{y/x}/m$ donde $s_{y/x}$ es la estimación estadística de los errores en la dirección del eje y [Miller, 2000], siendo igual a 3.74 ng/mL. Este valor es del mismo orden de

magnitud que el calculado en el trabajo citado anteriormente, 1.3 ng/mL [Petroou, 2002], aunque en su caso empleaban un criterio menos restrictivo (2s).

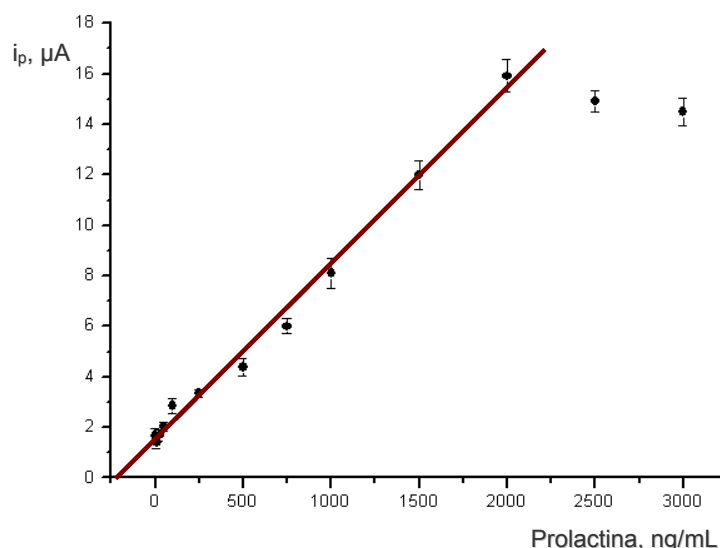


Figura 52.- Calibrado de prolactina.

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

Los inmunosensores basados en electrodos serigrafiados son, por lo general, desechables, lo que hace que se requiera un nuevo electrodo para la preparación de cada sensor y para cada medida de la concentración de analito. Esto hace que la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes inmunosensores fabricados de la misma manera, sea un aspecto esencial a evaluar con objeto de asegurar la utilidad práctica real del diseño. En este caso, los estudios realizados han contemplado diferentes variables relacionadas con la reproducibilidad y la estabilidad del inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs/ SPCE. En primer lugar se evaluó la reproducibilidad de las medidas efectuadas en el mismo día o en días diferentes para cuatro niveles de concentración de prolactina distintos (10, 100, 1000 y 2000 ng/mL) empleando cinco inmunosensores preparados para cada ensayo, encontrándose en el primer caso (un mismo día), desviaciones estándar relativas comprendidas entre 3 y 8 % ($n = 5$), y en el segundo (días diferentes), valores de RSD entre 7 y 9 % ($n = 5$). Estos resultados indican que es posible obtener respuestas voltamperométricas reproducibles dentro del margen esperado, utilizando

inmunosensores distintos durante el mismo o diferentes días, lo que demuestra que el proceso de fabricación del dispositivo es fiable.

También se evaluó la estabilidad de los bioconjugados utilizados para la preparación del inmunosensor. Para ello se prepararon el mismo día 30 tubos Eppendorf que contenían anti-prolactin-Biotin-Strept-MBs y se almacenaron a 4°C. Después, de forma sucesiva, cada día se prepararon inmunosensores con dicho conjugado y se realizaron tres medidas de la respuesta voltamperométrica de la prolactina en concentración de 2000 ng/mL. En la Figura 53 se ha representado un gráfico de control en el que se han señalado los márgenes de $\pm 3s$ correspondientes a la medida de la respuesta del inmunosensor el primer día de trabajo ($n = 10$). Como puede observarse en la Figura 53, la media de las tres medidas realizadas cada día se encuentra dentro de dichos límites durante al menos 34 días, que fue el periodo máximo de tiempo estudiado. Por otro lado, el valor de RSD correspondiente a la serie de medidas realizadas durante ese intervalo, fue del 6.0 %, lo que pone de manifiesto la excelente estabilidad de los conjugados anti-PRL-Biotin-Strept-MBs cuando se mantienen a 4°C. Esta característica tiene una gran importancia desde el punto de vista de la utilidad práctica del inmunosensor, ya que es posible preparar varios conjugados, almacenarlos en las condiciones indicadas y, posteriormente, en el momento que se precise, construir el inmunosensor de prolactina para su uso inmediato.

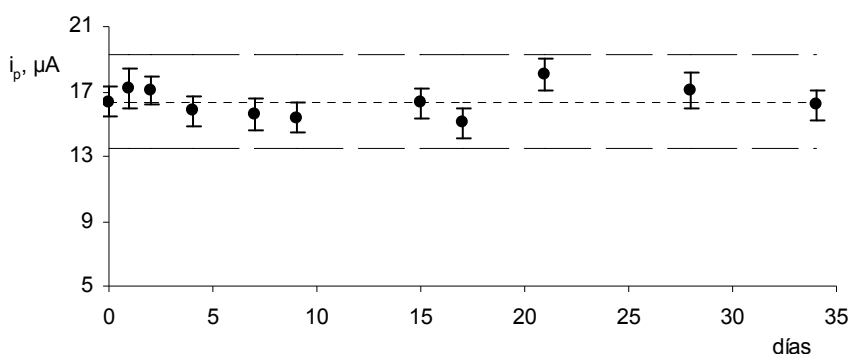


Figura 53.- Gráfico de control para la determinación de prolactina.

5.2.1.4. Estudios de reactividad cruzada

La prolactina se determina habitualmente en fluidos biológicos, en los que puede coexistir con otras hormonas y otros tipos de compuestos potencialmente interferentes. La selectividad del inmunosensor depende fundamentalmente de la especificidad del anticuerpo de captura empleado y, para su evaluación, es preciso conocer el nivel de respuesta del mismo frente a otras especies, es decir, su reactividad cruzada, en comparación con la respuesta no específica frente a un blanco. Las especies investigadas fueron: estriol, hormona del crecimiento humana (hGH), testosterona, melatonina, estradiol, cortisol, progesterona y corticosterona (ver estructuras químicas en las figuras 2, 5 y 19), realizándose medidas de la señal voltamperométrica del inmunosensor en disoluciones preparadas en ausencia de prolactina a diferentes niveles de concentración, 100, 1000 y 2000 ng/mL, de cada compuesto ensayado. En la Figura 54 se muestran los voltamperogramas en diferencial de impulsos obtenidos para las disoluciones de los interferentes al nivel más alto de concentración estudiado. Con fines comparativos, en la misma figura aparecen los voltamperogramas correspondientes a una disolución de prolactina de 2000 ng/mL (curva 1) y a un blanco, en ausencia de prolactina (curva 2). Esta última señal es la debida a las adsorciones inespecíficas, producidas probablemente por interacción del anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina con las micropartículas magnéticas funcionalizadas, y es inferior al 10% de la señal de la prolactina. Este resultado hizo que se considerara innecesario aplicar una etapa de bloqueo de la superficie de las Strept-MBs tras la inmovilización del anticuerpo de captura, con el fin de no alargar excesivamente el proceso de preparación del inmunosensor.

Como puede observarse, los voltamperogramas de los compuestos ensayados exhiben un pico de oxidación cuya intensidad es del mismo orden o menor que la correspondiente a la disolución del blanco. Esto indica que las señales obtenidas pueden atribuirse a adsorciones inespecíficas sobre las partículas magnéticas y, por tanto, puede afirmarse que ninguna de las sustancias investigadas interfiere de forma significativa en la respuesta del inmunosensor.

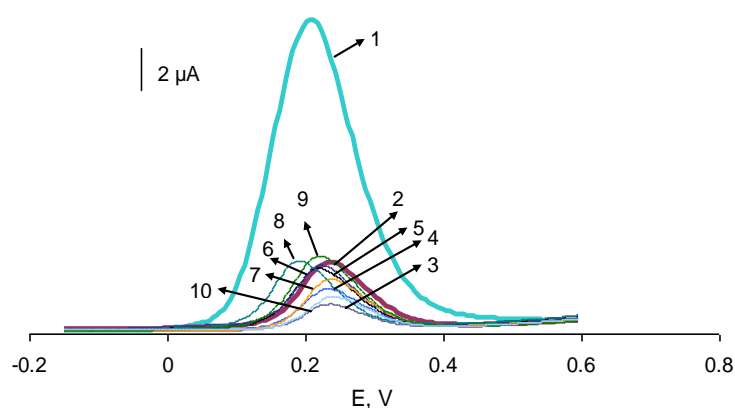


Figura 54.- Voltamperogramas DP de prolactina: 2000 ng/mL (1) y 0 ng/mL (2) y de 2000 ng/mL de: estriol (3), hGH (4), testosterona (5), melatonina (6), estradiol (7), cortisol (8), progesterona (9) y corticosterona (10).

La ausencia de reactividad cruzada se confirmó mediante la realización de un ensayo ELISA colorimétrico. Para ello, se modificaron los pocillos de una placa siguiendo las etapas de preparación del inmunosensor, incluyéndose una etapa de bloqueo con BSA del 2% tras la inmovilización del anticuerpo anti-PRL-Biotin. Seguidamente se añadió a cada pocillo prolactina o uno de los compuestos estudiados a dos concentraciones diferentes, 1000 y 2000 ng/mL y, finalmente, el anticuerpo marcado AP-anti-PRL. El revelado se realizó utilizando *p*-nitrofenilfosfato como sustrato de la enzima, que da lugar a una coloración amarilla. Como puede observarse en la Figura 55 los únicos pocillos que presentan dicha coloración son los que contenían la hormona prolactina y, con mucha menor intensidad de color, el que contenía únicamente el anticuerpo marcado. Estos resultados demuestran nuevamente la especificidad del anticuerpo de captura hacia la prolactina.

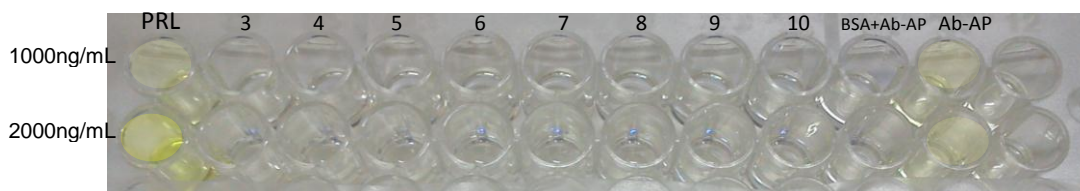


Figura 55.- Estudio de la reactividad cruzada mediante un ensayo tipo ELISA.

5.2.1.5. Aplicación a la determinación de prolactina en suero humano

Para demostrar la utilidad del inmunosensor desarrollado al análisis de muestras reales, se puso a punto la aplicación del mismo a la determinación de la hormona en una muestra de suero humano enriquecido con prolactina a tres concentraciones diferentes, todas ellas en el entorno del nivel que cabe esperar en este tipo de muestras, 10, 100 y 200 ng/mL.

En primer lugar, con el fin de evaluar el posible efecto matriz debido a los componentes endógenos del suero, se realizó un calibrado de la muestra por diluciones sucesivas de un suero contaminado con prolactina. La pendiente de este calibrado, de 7.1 nA mL/ng, es prácticamente igual al valor obtenido en el calibrado de patrones de prolactina (7.0 nA mL/ng). Estos resultados indican que prácticamente no existe efecto matriz, por lo que la determinación de prolactina en el suero puede llevarse a cabo mediante interpolación de la corriente de pico obtenida para las muestras en el calibrado de patrones. Utilizando esta estrategia se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 7. Como puede observarse, el método desarrollado, basado en el empleo del inmunosensor AP-anti-PRL-PRL-anti-PRL-Biotin-Strept-MBs/ SPCE, proporciona datos de la concentración muy próximos a los valores verdaderos, con buenos porcentajes de recuperación, lo que demuestra la utilidad del inmunosensor para la determinación de prolactina a bajos niveles de concentración en suero humano sin que sea necesario ningún tratamiento previo de la muestra, salvo su dilución.

Tabla 7.- Determinación de prolactina en suero humano enriquecido.

Prolactina, ng/mL	Concentración encontrada, ng/mL* (n=4)	% Recuperación
10	11 ± 2	110
100	103 ± 8	103
200	205 ± 10	102

*valor medio ± ts/√n

5.2.1.6. Conclusiones

El empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina permite llevar a cabo la inmovilización orientada del anticuerpo anti-prolactina biotinilado y facilita la preparación del inmunosensor. Estas ventajas, unidas a las que supone la utilización de electrodos serigrafiados de carbono, han hecho posible la construcción del primer inmunosensor electroquímico para prolactina, que presenta excelentes características analíticas en términos de sensibilidad, selectividad, intervalo de linealidad y reproducibilidad. Estas características mejoran las de la única configuración descrita en la literatura para esta hormona, basada en el empleo de detección fluorimétrica, y también las de los métodos de inmunoensayo convencionales. Por otra parte, si se comparan con los de los métodos de inmunoensayo que se muestran en la Tabla 1 de la parte de antecedentes, puede deducirse que el inmunosensor desarrollado presenta un intervalo lineal más amplio y, aunque el extremo inferior del intervalo de concentraciones es superior, la sensibilidad del método es suficiente para la determinación de prolactina a los niveles de concentración requeridos. Asimismo, el tiempo de análisis es similar al de la mayoría de los métodos de inmunoensayo que aparecen en dicha Tabla. Como conclusión final decir que la metodología desarrollada constituye una estrategia sencilla para la determinación rápida de prolactina en aplicaciones clínicas.

**5.2.2. INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA
CORTISOL BASADO EN MICROPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS CON
PROTEÍNA A**

Ya se ha comentado la importancia de la determinación de cortisol en muestras biológicas debido a su influencia en el balance energético, los niveles de azúcar en la sangre, la presión arterial y la reacción del organismo a las enfermedades y lesiones, o su consumo fraudulento en el dopaje deportivo. Al igual que en el caso de la prolactina, en el capítulo de Antecedentes (Apdo. 3.2.3.) se han descrito los métodos utilizados habitualmente para la determinación de esta hormona, incluidos los “kits” de inmunoensayo. Aunque en el momento de realizar estas investigaciones ya se habían publicado varios inmunosensores basados en diferentes técnicas de detección para esta aplicación, sin embargo se observó que estas configuraciones adolecían de algunas limitaciones, principalmente a nivel de sensibilidad, tiempo de análisis y coste. Debe destacarse el hecho de que la detección de moléculas de bajo peso molecular, como el cortisol, mediante el empleo de inmunosensores, presenta varias dificultades, entre las cuales se encuentra la imposibilidad del uso de configuraciones de inmunoensayo tipo sándwich. Esto hace que sea preciso establecer esquemas de tipo competitivo de menor sensibilidad. Teniendo esto en cuenta, el objetivo de este trabajo fue la preparación de un inmunosensor electroquímico para cortisol basado en el empleo de micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A y de electrodos serigrafiados para lograr, entre otras ventajas, la inmovilización orientada de altas concentraciones de anticuerpo y la obtención de respuestas analíticas de elevada magnitud. Como se verá, la consecución de este objetivo ha permitido mejorar las características analíticas de los métodos anteriores.

5.2.2.1. Configuración del inmunosensor

De acuerdo con el procedimiento descrito en la Parte Experimental (Apdo. 4.7.2.2.), en la Figura 56 se muestra un esquema de la construcción y el funcionamiento del inmunosensor. En este caso se han representado las etapas de preparación de los inmunoconjugados en los tubos eppendorf y las fases de lavado y de retirada de los reactivos sobrantes con ayuda de un pequeño imán. Para la preparación del magnetoinmunosensor electroquímico de cortisol, primero se inmoviliza el anticuerpo de captura, anti-cortisol, sobre las micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A (Protein A-MBs) y seguidamente se establece un ensayo competitivo entre el cortisol y el antígeno marcado con fosfatasa alcalina, AP-cortisol, por las posiciones de unión del anticuerpo. Para la determinación, el magnetoinmunoconjugado resultante, AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs, se inmoviliza sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE) con ayuda de un imán y, al igual que en el método anterior, se añade 1-naftilfosfato (1-NPP) y se registra la respuesta de oxidación del producto de la reacción enzimática, el 1-naftol (1-NP).

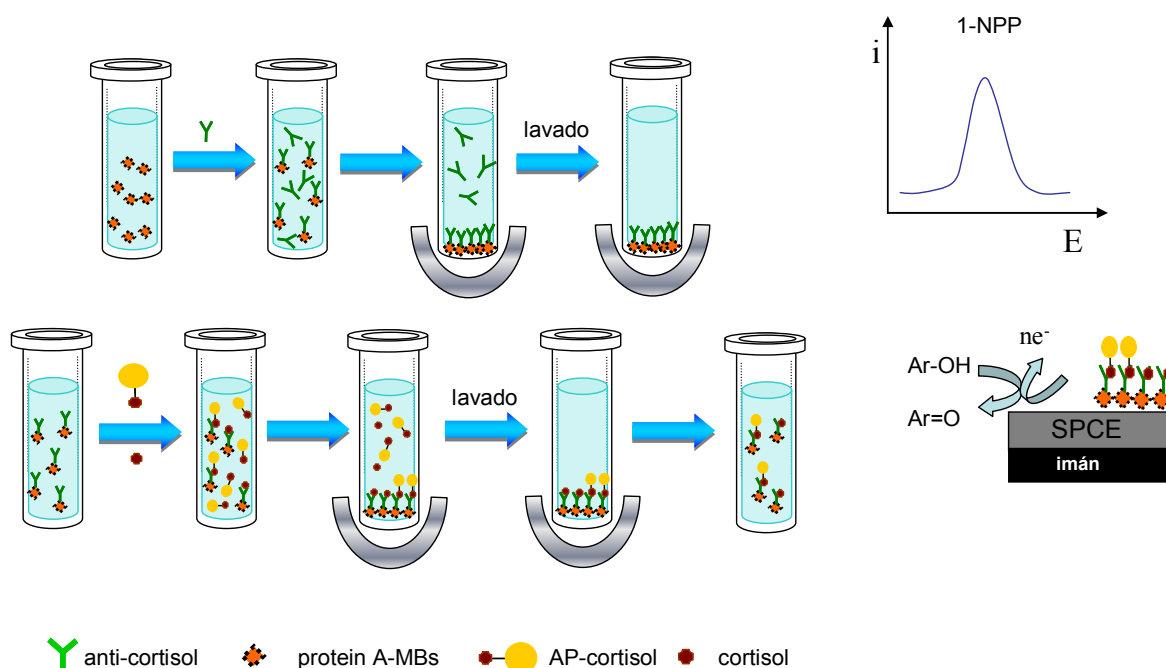


Figura 56.- Esquema de la preparación y el funcionamiento del inmunosensor.

5.2.2.2. Optimización de las variables experimentales

La optimización de las distintas variables experimentales implicadas en la preparación y la respuesta del inmunosensor se llevó a cabo empleando la técnica de voltamperometría diferencial de impulsos en medio regulador Trizma 0.1 M y MgCl_2 1 mM de pH 9.0, para monitorizar la respuesta de oxidación del 1-naftol.

Influencia de la cantidad de micropartículas magnéticas funcionalizadas

Para realizar este estudio se diseñaron dos series de experimentos, considerando primeramente la respuesta del inmunosensor en ausencia de cortisol y, después, en presencia de concentraciones variables de esta hormona. En primer lugar se prepararon varios inmunosensores con diferentes volúmenes de suspensión de micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A en el intervalo de 0.5 a 10 μL , correspondientes a cantidades comprendidas entre 15 a 300 μg de Protein A-MBs, en presencia de un exceso de anti-cortisol (23.90 $\mu\text{g/mL}$) y una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ de AP-cortisol. En la Figura 57a se muestra la influencia de esta variable sobre la intensidad de corriente, observándose el aumento lineal de la señal electroquímica hasta una cantidad de 60 μg , seguido de una disminución lenta de la misma. Esta tendencia se debe probablemente al incremento inicial de la cantidad de anticuerpo inmovilizado al aumentar la superficie disponible de micropartículas, hasta que se alcanza el nivel de saturación, suponiendo a continuación el exceso de partículas magnéticas un impedimento físico a la transferencia de electrones.

Por otro lado, en la Figura 57b se han representado los resultados obtenidos cuando se emplearon inmunosensores preparados con 1, 2 ó 10 μL de suspensión de Protein A-MBs (30, 60 ó 300 μg) para determinar concentraciones de cortisol comprendidas entre 10^{-6} y 10^2 ng/mL. Puede observarse cómo, a medida que disminuye la cantidad de partículas magnéticas, se obtiene una mayor corriente de pico, efecto que se hace más patente a las concentraciones más bajas de cortisol. Estos resultados indican que el empleo de una menor cantidad de micropartículas magnéticas y, consecuentemente, de anticuerpo, hace posible obtener una mayor pendiente del calibrado y, por tanto, una sensibilidad más alta, acompañada de un

intervalo dinámico de concentración más amplio. La tendencia observada está de acuerdo con lo esperado para una configuración de tipo competitivo, en la que la disminución de la concentración de anticuerpo (menor cantidad de micropartículas) conduce a una mayor sensibilidad, ya que se requiere menos analito para alcanzar un mismo nivel de referencia [Ruth, 2001; Eguílaz, 2010]. Por todo ello, la cantidad de partículas magnéticas seleccionada para estudios posteriores fue de 30 μg , lo que equivale a un volumen de suspensión de 1 μL .

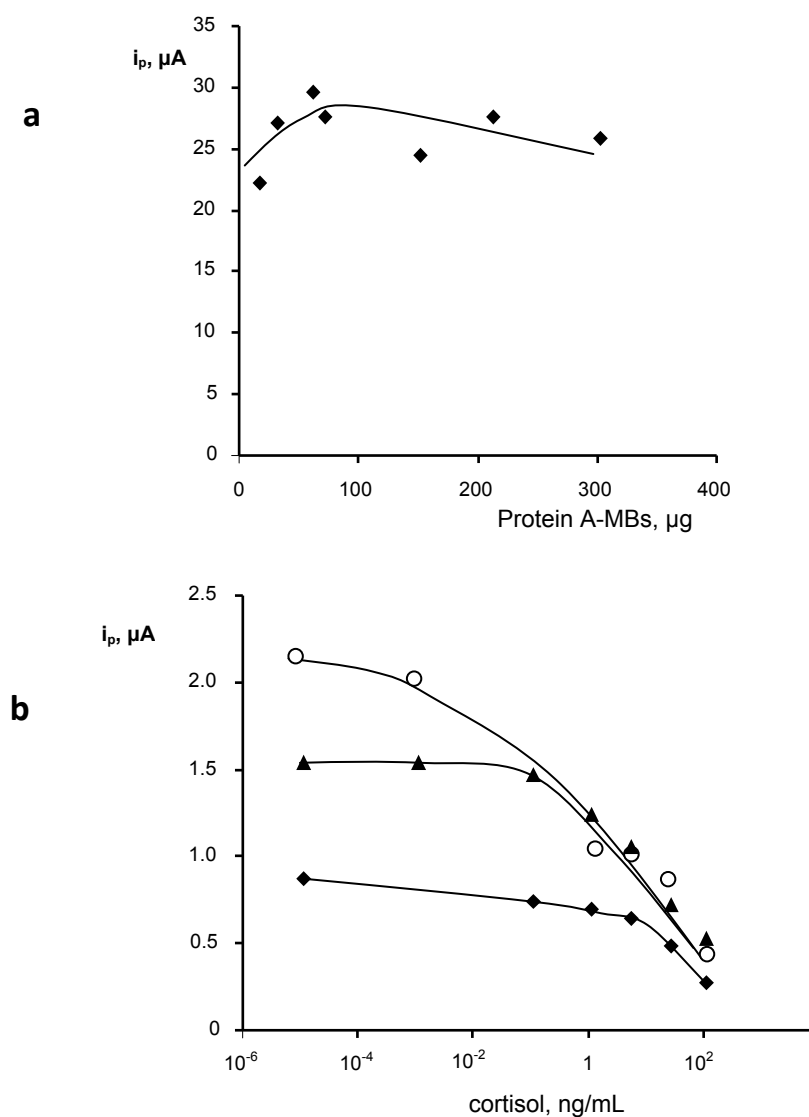


Figura 57.- Influencia de la cantidad de Protein A-MBs sobre la respuesta del inmunosensor: (a) en ausencia de cortisol; (b) en presencia de cortisol 10^{-6} - 10^2 M con 1 μL (30 μg) (\circ); 2 μL (60 μg) (\blacktriangle), 10 μL (300 μg) (\blacklozenge) de Protein A-MBs.

Influencia de la concentración y el tiempo de incubación de anti-cortisol

Como se ha visto anteriormente, la cantidad de anticuerpo de captura inmovilizado sobre las micropartículas magnéticas influye decisivamente en la sensibilidad y el intervalo de concentración de los calibrados. En este trabajo se estudió la influencia de la concentración de anti-cortisol sobre la corriente de pico en voltamperometría diferencial de impulsos, medida en ausencia de cortisol, con distintos inmunosensores preparados empleando 50 μL de anticuerpo de diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 12 $\mu\text{g/mL}$ en presencia de un exceso de AP-cortisol de 1 $\mu\text{g/mL}$ y 1-naftilfosfato 5 mM. Como puede observarse en la Figura 58, la corriente de pico aumenta rápidamente con la cantidad de anticuerpo, tendiendo a estabilizarse a las concentraciones más altas como consecuencia de la saturación de las posiciones de unión de las Protein A-MBs. Con el criterio de obtener una buena sensibilidad, al tiempo que disminuir en lo posible el coste del inmunosensor, se escogió una concentración óptima de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de anti-cortisol.

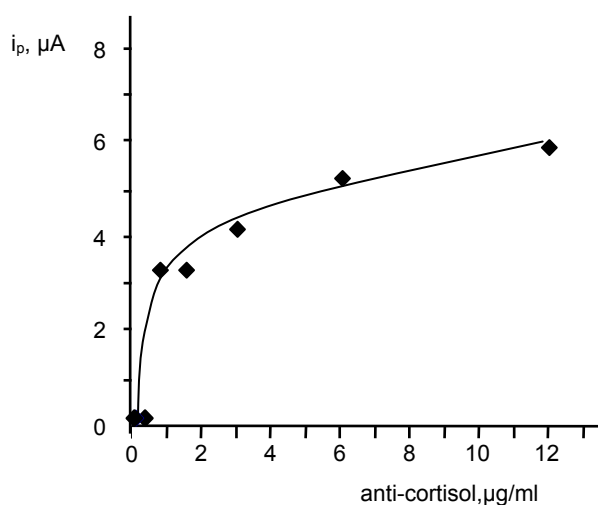


Figura 58.- Influencia de la concentración de anti-cortisol.

En cuanto al tiempo de incubación de la disolución de anti-cortisol sobre las Protein A-MBs, se investigó el periodo comprendido entre 0 y 60 minutos, con los resultados representados en la Figura 59. Puede observarse el incremento de la corriente de pico entre 0 y 10 minutos de incubación, y la tendencia a estabilizarse para tiempos superiores, hasta el máximo del intervalo estudiado. Estos resultados

llevaron a escoger un tiempo de 30 minutos como más apropiado para lograr la unión de la totalidad del anticuerpo con la proteína A de las micropartículas.

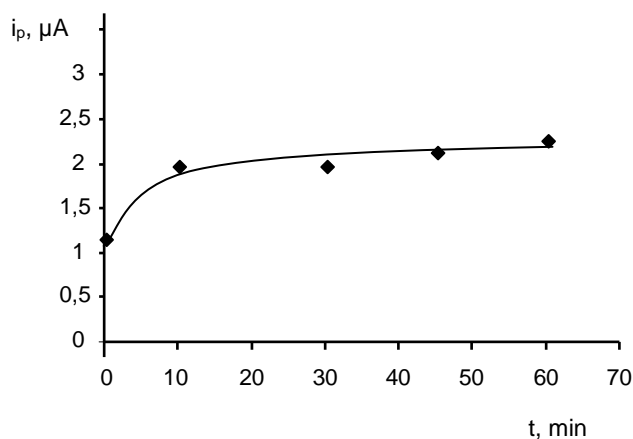


Figura 59.- Influencia del tiempo de incubación de anti-cortisol.

Influencia de la concentración y el tiempo de incubación de cortisol marcado con fosfatasa alcalina

Para la elección de la concentración de AP-cortisol se investigó la respuesta, en ausencia de cortisol, de varios inmunosensores preparados con concentraciones de este conjugado comprendidas entre 0 y 100 ng/mL. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 60, mostrando un rápido aumento de la corriente de pico a las menores concentraciones estudiadas, para pasar a estabilizarse partir de 50 ng/mL. Este valor debe corresponder a la saturación de las posiciones enlazantes del anticuerpo inmovilizado, por lo que se eligió como concentración óptima de cortisol marcado.

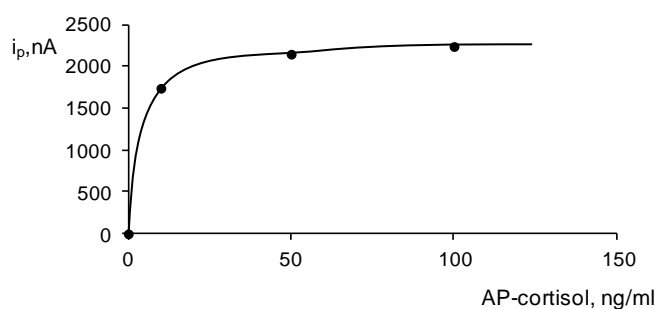


Figura 60.- Influencia de la concentración de AP-cortisol.

Se estudió la influencia del tiempo de incubación del inmunoconjugado anti-cortisol-Protein A-MBs en disoluciones de AP-cortisol de 50 ng/mL en ausencia y en presencia de 0.01 ng/mL de cortisol. Este tiempo de incubación o de competición corresponde al periodo en el que el antígeno (cortisol) y el antígeno marcado (AP-cortisol) compiten por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado sobre las partículas magnéticas. Como puede observarse (Figura 61), al aumentar el tiempo de incubación en la disolución de la hormona marcada, se produce el aumento de la corriente de oxidación del 1-naftol tanto en ausencia (●) como en presencia (○) de cortisol, lo que indica que la reacción antígeno-anticuerpo se produce en mayor extensión. Sin embargo, a partir de 45 minutos, disminuye la magnitud de la respuesta, lo que puede atribuirse a un mayor bloqueo de la superficie electródica como consecuencia de una mayor cantidad de proteína inmovilizada. Por otro lado, las mayores diferencias de señal obtenidas en ausencia y en presencia de analito se registraron a tiempos de 30 y 45 minutos. Por tanto, teniendo en cuenta este comportamiento, se seleccionó como valor óptimo un tiempo de competición de 45 minutos.

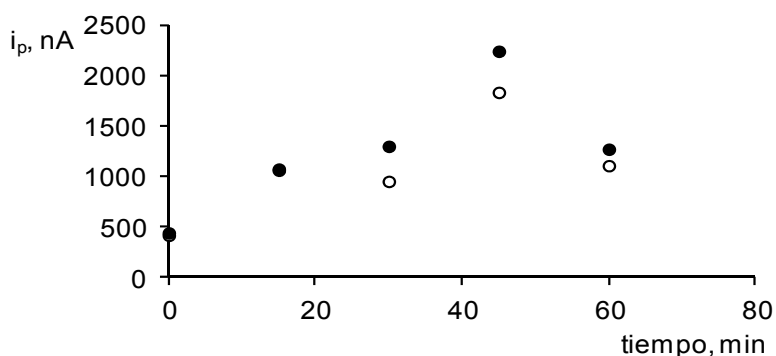


Figura 61.- Influencia del tiempo de incubación del inmunoconjugado anti-cortisol-Protein A-MBs en disoluciones de AP-cortisol: en ausencia (●) y en presencia (○) de 0.01 ng/mL de cortisol.

Influencia de la concentración de sustrato enzimático y del tiempo de hidrólisis

Al igual que en el trabajo anterior y, como ya se ha indicado, el sustrato de la fosfatasa alcalina elegido para llevar a cabo la determinación de cortisol fue el 1-naftil fosfato. Esta elección se debe a que se utilizaron los mismos electrodos serigrafados de carbono, SPCEs, que en el caso del inmunosensor de prolactina, por lo que los resultados obtenidos en la selección del sustrato, presentados anteriormente, son válidos para ambas configuraciones. También se utilizó el mismo medio regulador de pH Trizma 0.1 M y MgCl_2 1 mM de pH 9.0, debido a la mayor actividad de la enzima. Para optimizar la concentración de sustrato empleada en el ensayo, se investigó la influencia de esta variable en el intervalo de 5×10^{-5} a 1 M, sobre la respuesta del inmunosensor preparado en las condiciones experimentales anteriores, en ausencia de cortisol. Los resultados representados en la Figura 62 muestran el aumento rápido de la corriente de pico con la concentración de sustrato hasta 0.005 M, permaneciendo prácticamente constante para valores superiores. Por tanto, este valor fue seleccionado como óptimo con el fin de asegurar que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de enzima.

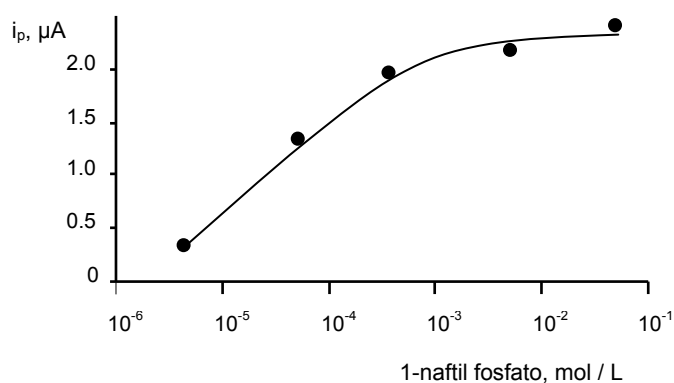


Figura 62.- Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato.

Finalmente se optimizó el tiempo durante el que se mantiene el sustrato de la enzima en contacto con el inmunosensor antes de proceder al registro del voltamperograma en DPV. El intervalo estudiado fue de cero a 60 min. Este es el periodo en el que se produce la reacción de hidrólisis y desfosforilación catalizada por

la enzima. Los resultados obtenidos, empleando inmunosensores preparados en las condiciones anteriores, se han representado en la Figura 63, apreciándose un aumento lineal de la corriente de oxidación del 1-naftol con el tiempo de hidrólisis del sustrato, como consecuencia de la generación de una mayor concentración de producto. Como solución de compromiso entre una buena sensibilidad y un corto tiempo de análisis, se escogió un tiempo de hidrólisis de ocho minutos.

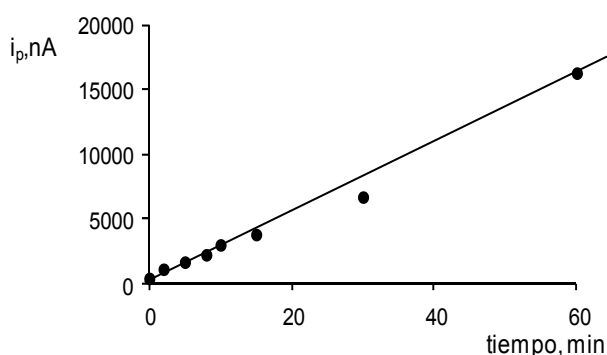


Figura 63.- Influencia del tiempo de hidrólisis.

En la Tabla 8 se resumen las variables estudiadas, los intervalos considerados y el valor elegido en cada caso.

Tabla 8.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs/SPCE para la determinación de cortisol.

Variable experimental	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Volumen de suspensión de Protein-MBs, μL	0.5-10	1
anti-cortisol, $\mu g/mL$	0-12	1.5
Tiempo de incubación del anti-cortisol, min	0-60	30
AP-cortisol, ng/mL	0-100	50
Tiempo de competición, min	0-60	45
1-naftilfosfato, M	5×10^{-6} -01	0.005
Tiempo de hidrólisis, min	0-60	8

5.2.2.3. Calibrado y características analíticas

Empleando las condiciones experimentales previamente optimizadas, se construyó un calibrado para cortisol mediante voltamperometría diferencial de impulsos en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10^{-6} y 10^4 ng/mL. La curva obtenida (Figura 64) muestra la forma típica que cabe esperar en los formatos de inmunoensayo competitivo, ajustándose ($r = 0.998$) a la siguiente ecuación paramétrica [Tijssen, 1985]:

$$y = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x} \right)^h} + i_{\min}$$

donde i_{\max} , $2.22 \pm 0.04 \mu A$, es el valor de corriente máxima correspondiente a la señal en ausencia de analito e i_{\min} , $0.31 \pm 0.04 \mu A$, es la corriente mínima que corresponde a la señal obtenida en exceso de analito. La pendiente de Hill obtenida fue $h = -0.34 \pm 0.03$, y el valor de EC_{50} , de 0.19 ± 0.05 ng/mL. Este valor de EC_{50} corresponde al punto de inflexión de la curva de calibrado y equivale a la concentración de cortisol que da lugar al 50 % de inhibición respecto del valor máximo i_{\max} . Así, puede decirse que cuanto menor es el valor del EC_{50} , mayor es la constante de afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo.

El intervalo de linealidad del calibrado se extiende entre 5.0×10^{-3} y 150 ng/mL ($r = 0.993$). Como puede observarse, se trata de un amplio margen de concentraciones, abarcando más de cuatro órdenes de magnitud, lo que está de acuerdo con el bajo valor de la pendiente de Hill obtenido [Tijssen, 1985]. Por otra parte, el límite de detección se calculó a partir de la siguiente ecuación [Conneely, 2007]:

$$LOD = EC_{50} \left(\frac{i_{\max} - i_{\min}}{i_{\max} - i_{\min} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

donde s es la desviación estándar ($n = 10$) del punto cero, medido en ausencia de cortisol. El valor medio de la corriente para este punto fue $i_p \pm s$ igual a $2.26 \pm 0.13 \mu A$, con una desviación estándar relativa del 5.7%. De acuerdo con estos datos, el límite de detección calculado fue de 3.5 pg/mL de cortisol. Este valor es mucho más bajo que los límites de detección encontrados para el cortisol en la bibliografía, tal como puede

observarse a la vista de la Tabla 3 de la Introducción de esta Memoria. Por ejemplo, el límite de detección obtenido es más de 20 veces inferior al límite más bajo de los reportados en el momento de realizar estas investigaciones, 72 pg/mL [Anfossi, 2002].

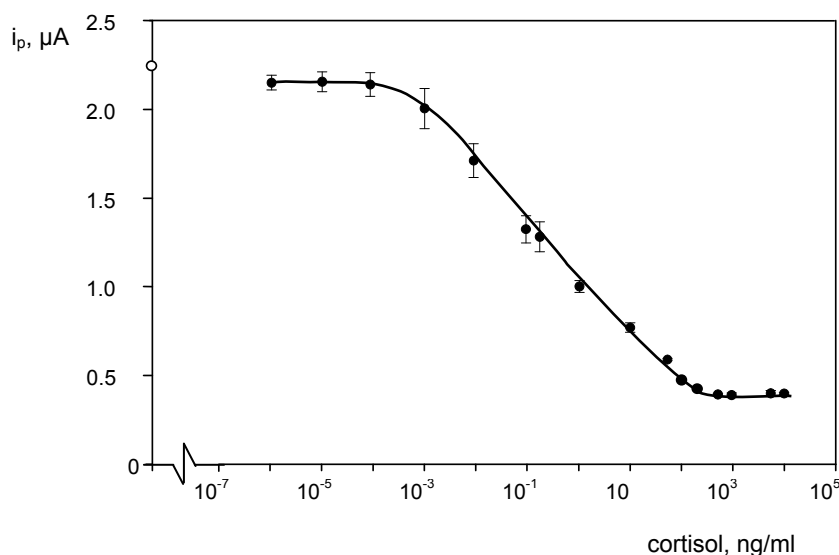


Figura 64.- Calibrado de cortisol.

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

Para llevar a cabo los estudios de reproducibilidad y estabilidad de las señales analíticas, se investigaron diferentes aspectos relacionados con estos parámetros, realizando medidas repetidas con el inmunosensor desarrollado. En primer lugar se estudió la reproducibilidad, utilizando ocho inmunosensores diferentes preparados simultáneamente con el mismo material, así como con un único inmunosensor durante un mismo día de trabajo. Estos estudios se realizaron en ausencia de cortisol y en presencia de una concentración de cortisol de 0.2 ng/mL, que es la correspondiente al punto EC_{50} . Los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos en estas condiciones fueron, respectivamente, en ausencia y en presencia de cortisol, del 7.4 % y 8.4 % para medidas en días diferentes, y del 5.7 % y 5.8 % para medidas sucesivas en el mismo día. Estos valores demuestran que el proceso de fabricación del inmunosensor es fiable, y que permite obtener respuestas reproducibles con diferentes inmunosensores preparados de la misma manera.

Por otro lado, también se evaluó la estabilidad de los conjugados anti-cortisol-Protein A-MBs. Para realizar este estudio, se prepararon varios tubos eppendorf conteniendo la misma cantidad de conjugado y se almacenaron a 4°C. Cada día se utilizó un conjugado para preparar el inmunosensor y medir la respuesta de corriente en ausencia de cortisol. En la Figura 65 se ha representado un gráfico de control en el que se han señalado los márgenes de $\pm 3s$ correspondientes a la medida de la respuesta del inmunosensor el primer día de trabajo. La desviación estándar relativa correspondiente a las medias realizadas en un periodo de tiempo de 30 días fue RSD = 8.5% ($n = 10$). Estos resultados ponen de manifiesto que los conjugados MBs-anticortisol son estables durante al menos 1 mes cuando se almacenan a 4°C. Al igual que se comentó en el inmunosensor de prolactina, esta característica tiene una gran importancia desde el punto de vista práctico, ya que una vez preparados los inmunoconjugados, pueden almacenarse en condiciones adecuadas, empleándolos posteriormente, cuando se precise, para la construcción y uso inmediato del inmunosensor.

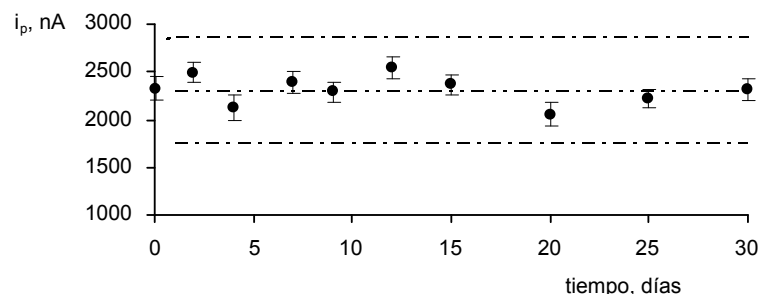


Figura 65.- Gráfico de control para la determinación de prolactina.

5.2.2.4. Estudios de reactividad cruzada

Del mismo modo que ocurre con otros analitos de interés clínico, en las muestras biológicas de interés para la determinación de cortisol, este se encuentra en presencia de otros compuestos potencialmente interferentes. Por ejemplo, en el suero pueden coexistir varios corticosteroides de estructura similar a la de esta hormona. Con el fin de evaluar la selectividad de la configuración desarrollada, se estudió la influencia de la presencia de algunos de estos compuestos, estrechamente

relacionados con el cortisol, sobre la respuesta del inmunosensor. Las especies ensayadas fueron cortexolona, corticosterona, cortisona, tetrahydrocortisol y progesterona, que, como puede observarse en la Figura 5, poseen estructuras químicas similares a la del cortisol.

La forma de investigar el grado de especificidad del inmunosensor consistió en medir los valores de EC_{50} para cada uno de los compuestos ensayados a partir de su correspondiente calibrado obtenido en ausencia de cortisol. Estos se han representado en la Figura 66 comparados con el del analito, observándose que los intervalos de variación de la corriente con la concentración de cada especie aparecen bastante desplazados hacia la derecha, es decir, en los niveles de concentración más altos, que a su vez corresponden a valores de EC_{50} muy superiores al del cortisol. En la Tabla 9, se recogen estos valores, así como los datos de la reactividad cruzada (%CR), calculados a partir del EC_{50} de cada compuesto estudiado. Como puede observarse, todas las especies ensayadas proporcionaron valores de %CR muy bajos, inferiores al 0.03%, lo que indica una excelente selectividad del anticuerpo utilizado para la preparación del inmunosensor, respecto al cortisol. Se aprecia también que los valores de reactividad cruzada más altos corresponden a la corticosterona (%CR = 1.9×10^{-3}) y a la cortexolona (%CR = 0.03), debido a que estas moléculas se diferencian de la de cortisol únicamente en la presencia de un grupo hidroxilo en posición 11 ó 17, respectivamente.

Tabla 9.- Reactividad cruzada para anti-cortisol- Protein A-MBs/SPCE.

Compuesto	EC_{50} , ng/mL	% CR*
cortisol	0.19 ± 0.05	100
cortexolona	$(0.6 \pm 0.9) 10^3$	0.03
corticosterona	$(1.0 \pm 0.3) 10^4$	1.9×10^{-3}
cortisona	$(2.7 \pm 0.3) 10^4$	7.0×10^{-4}
hidrocortisol	$(6 \pm 1) 10^5$	3.2×10^{-5}
progesterona	$>10^7$	$< 2 \times 10^{-6}$

$$*\% \text{ CR} = 100(EC_{50})_{\text{cortisol}} / (EC_{50})_{\text{interferente}}$$

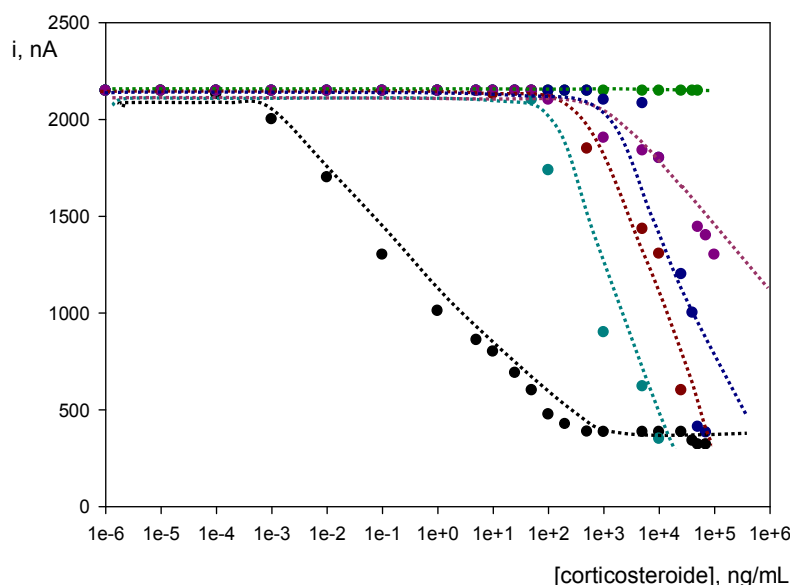


Figura 66.- Calibrados de ● cortisol; ● corticosterona; ● progesterona; ● cortisona; ● cortexolona; ● hidrocortisol.

5.2.2.5. Aplicación a la determinación de cortisol en suero humano

La validación del inmunosensor desarrollado se realizó llevando a cabo la determinación de cortisol en dos muestras de suero certificadas, ERM DA192 y ERM DA193, que contenían diferente concentración de hormona, 98.8 y 277 ng/mL, respectivamente.

En primer lugar se investigó la posible existencia de efecto matriz obteniendo calibrados de las muestras por dilución de ambos sueros, aplicando el procedimiento descrito en el Apdo. 4.7.4.5. Los resultados obtenidos aparecen representados en la Figura 67, observándose que las curvas correspondientes a las muestras son muy similares a la curva obtenida con patrones de cortisol. Los valores de la pendiente de Hill para estos calibrados fueron -0.37 ± 0.05 y -0.29 ± 0.07 ng/mL para los sueros DA192 y DA193, respectivamente, siendo estadísticamente comparables al del calibrado de patrones de cortisol, $h = -0.34 \pm 0.03$ ng/mL.

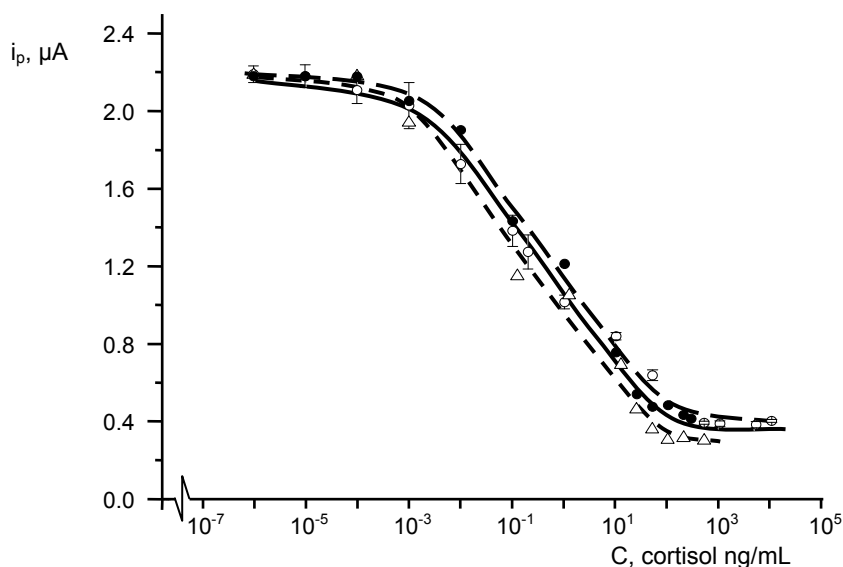


Figura 67.- Calibrados de disoluciones patrón de cortisol (O) y de las muestras certificadas de suero: ERM-DA192 (●) y ERM-DA193 (△).

Asimismo, se realizó la comparación estadística de los tramos rectos del calibrado de patrones de cortisol con los obtenidos para las dos muestras certificadas, habiéndose representado los resultados obtenidos en la figura 68. Los parámetros correspondientes a las rectas de regresión obtenidas se recogen en la Tabla 10. Como puede observarse, el cero si está contenido en los intervalos de confianza de las ordenadas en el origen, lo que indica que no hay errores sistemáticos constantes en los análisis. Además, la unidad está incluida en el intervalo de confianza de las pendientes, lo que sugiere la no existencia de errores sistemáticos proporcionales, es decir, dependientes del contenido de cortisol en la muestra. Finalmente, los coeficientes de correlación obtenidos, $r = 0.998$ y $r = 0.997$ para ambas muestras de suero, respectivamente, indican que los datos experimentales se ajustan bien a las rectas de regresión correspondientes, lo que pone de manifiesto la buena correlación que existe entre el calibrado de patrones y los calibrados obtenidos empleando las muestras de suero. Por ello, la determinación de la hormona en las muestras de suero pudo realizarse por interpolación de las medidas de la intensidad de pico en el calibrado de patrones.

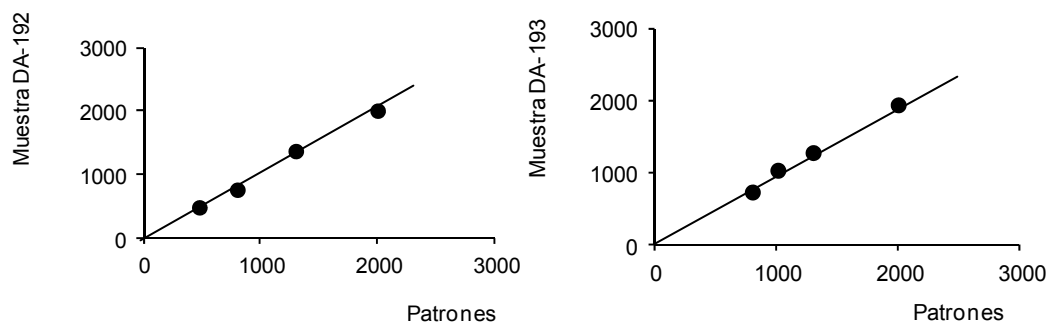


Figura 68.- Comparación estadística de los tramos rectos del calibrado de patrones de cortisol con los obtenidos para las dos muestras certificadas.

Tabla 10.- Parámetros característicos de las rectas de regresión obtenidas al comparar los resultados que proporciona el calibrado de patrones de cortisol con el calibrado obtenido empleando diferentes diluciones de las muestras de suero certificadas.

Muestra	Pendiente	Ordenada en el origen	r
Muestra DA-192	1.01 ± 0.04	0.1 ± 0.1	0.998
Muestra DA-193	0.98 ± 0.05	0.1 ± 0.1	0.997

En la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos en la determinación de cortisol en distintas muestras de sueros diluidos, que contenían concentraciones de la hormona dentro del intervalo recto del calibrado. Como puede observarse, la metodología desarrollada, basada en el empleo del inmunosensor AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs/SPCE, es adecuada para llevar a cabo este tipo de análisis, sin necesidad de aplicar ningún tipo de tratamiento de muestra, salvo la dilución. Estos resultados demuestran la utilidad del inmunosensor para la determinación de bajas concentraciones de cortisol en suero humano, pero también su capacidad para ser aplicado en un amplio margen de concentraciones, en este mismo tipo de muestra, obteniendo resultados con buenos niveles de precisión y exactitud.

Tabla 11.- Determinación de cortisol en suero humano certificado.

Muestra	Cortisol, ng/mL	Cortisol encontrado, ng/mL*
ERM-DA192		
1	0.001	0.0012 ± 0.0006
2	0.100	0.10 ± 0.01
3	10.0	12 ± 2
4	100	104 ± 2
ERM-DA193		
1	0.001	0.0013 ± 0.0005
2	0.120	0.116 ± 0.005
3	1.24	1.4 ± 0.2
4	12.4	12 ± 2

*valor medio ± ts/√n

5.2.2.6. Conclusiones

El inmunosensor electroquímico para cortisol, basado en el empleo de micropartículas magnéticas y electrodos serigrafiados de carbono, presenta un alto rendimiento analítico en términos de sensibilidad, amplio intervalo lineal, reproducibilidad y selectividad. Estas características hacen que la metodología desarrollada pueda ser comparada favorablemente con la descrita anteriormente basada en el empleo de otros inmunosensores o en la realización de inmunoensayos convencionales. Cabe destacar que el límite de detección es más de 15 veces menor que el del inmunoensayo comercial más sensible de los que aparecen en la Tabla 2.

Además, se ha demostrado la utilidad del magnetoinmunosensor para la determinación de cortisol en muestras biológicas de interés en medicina deportiva y análisis clínicos.

**5.2.3. EMPLEO DE UN ELECTRODO COMPÓSITO
DE TAMAÑO MICROMÉTRICO
COMO DETECTOR PARA LA DETERMINACIÓN
INMUNOELECTROQUÍMICA DE CORTISOL**

Como se ha comentado en los primeros capítulos de esta memoria, los electrodos compósitos nanoestructurados combinan las ventajas propias de los nanomateriales con las derivadas de estos electrodos, principalmente la obtención de bajas corrientes de fondo, la posibilidad de regeneración y su versatilidad. Algunas de estas ventajas han sido demostradas anteriormente, en la preparación de biosensores enzimáticos para la determinación de androsterona. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esa aplicación, así como los correspondientes al magnetoinmunosensor para cortisol descrito en el capítulo anterior, se consideró adecuado investigar la utilidad de los electrodos compósitos AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ fabricados a escala micrométrica como plataformas de detección para la determinación inmunoelectroquímica de cortisol. Con ello se pretende aprovechar las características especiales de estos electrodos, en particular las relacionadas con su pequeño tamaño y con las propiedades únicas del material nanoestructurado en que se basan, para poner a punto una nueva metodología de monitorización para este tipo de análisis aplicable a muestras reales de interés clínico.

5.2.3.1. Fundamento del método

El procedimiento experimental seguido para llevar a cabo la determinación de cortisol empleando el electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ ha sido descrito detalladamente en el Apdo. 4.7.4.3. Como puede observarse en la Figura 69, primero se preparan los inmunoconjugados AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs de forma análoga a la descrita en el capítulo anterior y, una vez transcurrido el tiempo de incubación, se resuspenden en 45 μ L de regulador Trizma 0.1 M de pH 9.0 al que se añaden 5 μ L de 1-naftilfosfato 50 mM. Tras 8 minutos se transfiere la disolución a una célula electroquímica de 500 μ L. La respuesta de oxidación del 1-naftol generado se mide sobre un electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ de 500 μ m mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) en el intervalo de potencial comprendido entre -0.15 y +0.60 V.

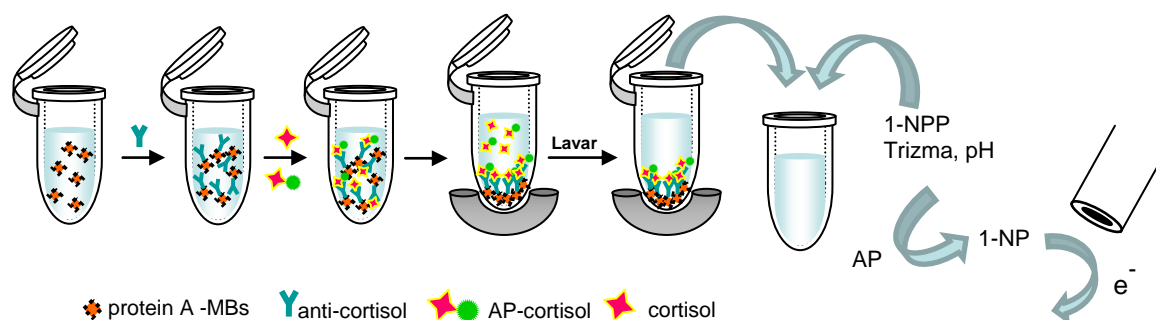


Figura 69.- Esquema del método de determinación de cortisol empleando un electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ de tamaño micrométrico.

5.2.3.2. Optimización de las variables experimentales

Las variables implicadas en la preparación de los inmunoconjugados han sido optimizadas en el capítulo anterior. Por eso, en esta parte se consideran únicamente las que afectan a la detección sobre el electrodo compuesto del 1-naftol generado en la reacción de hidrólisis del 1-naftilfosfato.

Composición y tamaño del electrodo

En el Capítulo 5.1 se describió la preparación de varios electrodos compósitos nanoestructurados de tamaño convencional y micrométrico basados en pasta de nanotubos de carbono y un líquido iónico, en presencia o no de nanopartículas de oro. Teniendo en cuenta los datos aportados, en esta parte se eligió el material del electrodo, con el objetivo de obtener las mejores características analíticas en la detección de 1-naftol. Para ello, se estudiaron las respuestas de oxidación electroquímica de este compuesto frente a diferentes tipos de pastas. Como ejemplo de las investigaciones realizadas, se muestran a continuación algunos de los resultados obtenidos.

En la Figura 70 se comparan los voltamperogramas cíclicos de una disolución de 1-naftol 1 mM sobre electrodos compósitos de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y el líquido iónico hexafluorofosfato de n-octilpiridinio (OPPF₆) preparados en ausencia (---) o en presencia (—) de nanopartículas de oro (AuNPs).

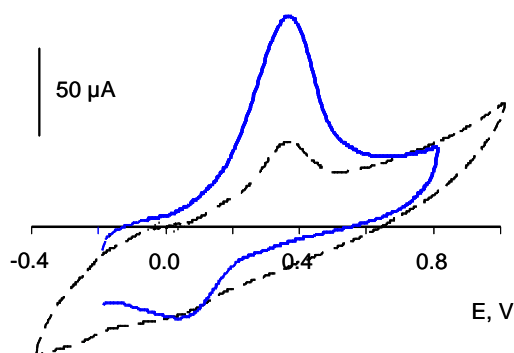


Figura 70.- Voltamperogramas cíclicos sobre AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ (—) y sobre MWCNTs/OPPF₆ (---) de 1-naftol; PBS 0.05 M de pH 7.4; $\nu = 100$ mV/s.

Como puede observarse, el material electródico preparado en presencia de nanopartículas de oro proporciona una respuesta más sensible y mejor definida. Esto es debido probablemente al efecto sinérgico originado por la combinación de ambos nanomateriales que, como ya se ha señalado, fue observado anteriormente por nuestro grupo en la preparación de biosensores basados en electrodos de AuNPs, MWCNTs y teflón, aplicados a la determinación de glucosa y de etanol [Manso, 2007; Manso, 2008].

Por otro lado, en la Figura 71 se han representado los valores de la corriente en estado estacionario del 1-naftol en función del potencial aplicado, obtenidos frente a diferentes electrodos compósitos preparados con distintos materiales, todos ellos basados en nanopartículas de oro. Como puede observarse, la sustitución del grafito por nanotubos de carbono en el material que contiene teflón como aglutinante, da lugar a un ligero aumento de la respuesta electroquímica. Esto es debido a la mayor conductividad de la pasta resultante en presencia de MWCNTs. Por otro lado, cuando se utiliza el líquido iónico OPF₆, tiene lugar un fuerte incremento de las señales de corriente respecto a las obtenidas con el electrodo AuNPs/MWCNTs/teflón, obteniéndose además corrientes significativas a partir de un potencial de +0.1 V. Este comportamiento se explica teniendo en cuenta nuevamente el incremento de la conductividad del material electródico producido en este caso por la presencia del líquido iónico, respecto al uso de teflón. Como se ha señalado, este comportamiento se ha observado en otras aplicaciones [Pedano, 2004; Opallo, 2011] y se debe al efecto sinérgico producido por la mezcla de nanotubos de carbono con este tipo de electrólitos y a las interacciones entre ambos, que promueven la existencia de intensos efectos electrocatalíticos [Tunckol, 2012]. Los resultados obtenidos permiten elegir el material compuesto AuNPs/MWCNTs/OPF₆ como más adecuado para la detección de 1-naftol.

Una vez seleccionado el material del electrodo compuesto, se construyó un dispositivo de tamaño micrométrico según el procedimiento descrito en el apartado 4.7.1.3 de la Parte Experimental, investigándose su comportamiento frente a la respuesta del 1-naftol con el fin de utilizarlo para realizar medidas en pequeños volúmenes de muestra. Como ejemplo de los estudios realizados, en la Figura 72 se han representado algunos voltamperogramas cíclicos de disoluciones de 1-naftol 5 mM, obtenidos frente a un electrodo compuesto de AuNPs/MWCNTs/OPF₆ observándose en ambos casos la aparición de un pico de oxidación bien definido. Esto pone de manifiesto la posibilidad de utilizar este pequeño electrodo para llevar a cabo la detección de este compuesto en la determinación inmunolectroquímica de cortisol.

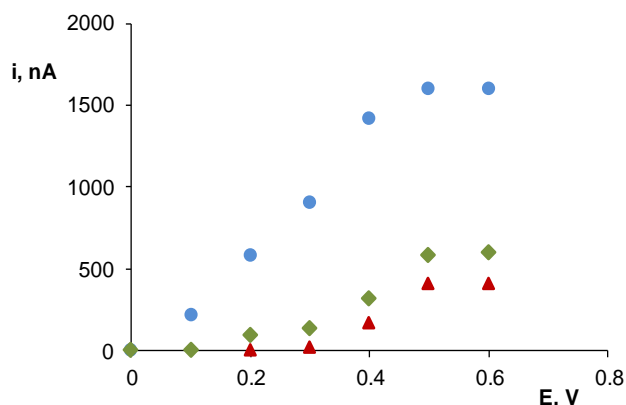


Figura 71.- Variación de la corriente con el potencial para 1-naftol 3.5 mM sobre: (●) AuNPs/MWCNTs/OPPF₆; (◆) AuNPs/MWCNTs/teflón; (▲) AuNPs/grafito/teflón; PBS 0.05 M pH 7.4.

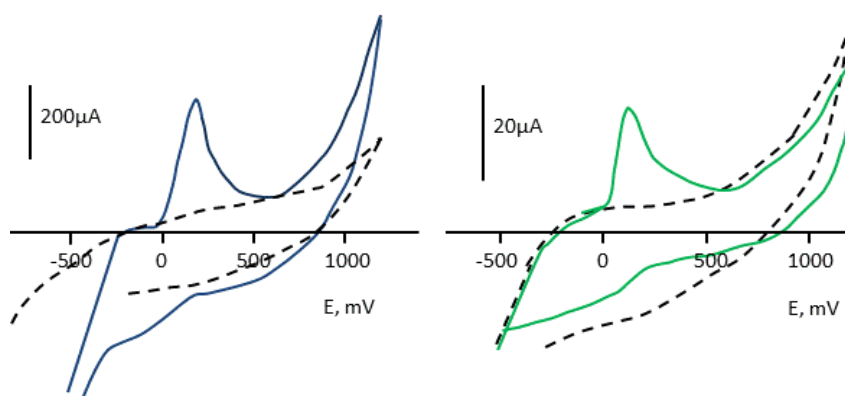


Figura 72.- Voltamperogramas cíclicos de 1-naftol 5 mM sobre un electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆: (—) de tamaño convencional ($\phi = 3$ mm) y (—) de tamaño micrométrico ($\phi = 500$ μ m); (---) PBS 0.05 M de pH 7.4. $v = 100$ mV/s.

El electrodo de menor tamaño, con un área geométrica de 1.96×10^{-3} cm², proporciona, lógicamente, una corriente de menor magnitud que la del electrodo de tamaño convencional, con un área de 7.1×10^{-2} cm². Sin embargo, los valores de la densidad de corriente calculados para cada electrodo fueron $1.07 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ y $0.43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, respectivamente. Este resultado está de acuerdo con lo visto anteriormente para la detección de androsterona sobre este mismo electrodo (Apdo. 5.1.3.). Como se dijo, aunque el tamaño del electrodo más pequeño es superior al límite establecido para que pueda ser considerado un verdadero microelectrodo (dimensión crítica, $r \leq 100 \mu\text{m}$), el hecho de que proporcione una densidad de corriente más alta, revela un comportamiento similar.

Parámetros característicos de la voltamperometría de onda cuadrada

La técnica elegida para llevar a cabo la detección de la respuesta de oxidación electroquímica del 1-naftol fue la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) debido a su rapidez y elevada sensibilidad. Con el fin de obtener picos bien definidos que presentaran la mayor relación señal-ruido posible, se optimizaron las variables características de esta técnica con los siguientes resultados: amplitud de la onda cuadrada, $\Delta E_s = 20$ mV; altura del impulso, $E_{sw} = 5$ mV, y frecuencia, $f = 8$ Hz. En la Figura 73 se han representado los voltamperogramas de onda cuadrada registrados sobre el electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ sumergido en una célula de 500 μ L que contiene la disolución sobrenadante resultante de la reacción enzimática que tiene lugar cuando se adicionan 45 μ L de Trizma 0.1 M de pH 9.0 y 5 μ L de 1-naftilfosfato 50 mM al conjugado AP-cortisol/Protein A-MBs (- - -) o al AP-cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs (—) y se dejan transcurrir 8 minutos.

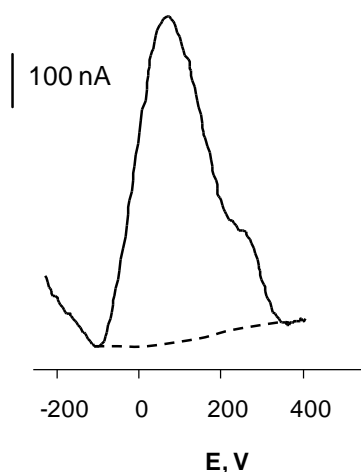


Figura 73.- Voltamperogramas de onda cuadrada registrados sobre AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ añadiendo 1-naftilfosfato y Trizma 0.1 M de pH 9.0, a: (- - -) AP-cortisol/Protein A-MBs; (—) AP-cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs.

Como puede observarse, la oxidación del 1-naftol formado en la reacción enzimática da lugar a un pico bien definido que se diferencia claramente de la señal inespecífica obtenida sobre partículas magnéticas en ausencia del anticuerpo inmovilizado. Es de destacar que el potencial de pico, $E_p = +65$ mV, es mucho menos positivo que el obtenido sobre otros electrodos en el mismo medio.

5.2.3.3. Calibrado y características analíticas

En las condiciones de trabajo previamente optimizadas, se obtuvo un calibrado para cortisol en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10^{-4} y 500 ng/mL (Figura 74). Como era de esperar, la curva obtenida presenta el hábito típico del formato competitivo, ajustándose ($r = 0.995$) a la misma ecuación paramétrica que en el método anterior:

$$y = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x} \right)^h} + i_{\min}$$

donde $i_{\max} = 408 \pm 11$ nA e $i_{\min} = 28 \pm 9$ nA son las corrientes máxima y mínima de la curva, $EC_{50} = 0.46 \pm 0.06$ ng/mL, la concentración de cortisol que proporciona el 50% de la señal máxima, y $h = 1.09 \pm 0.15$, la pendiente de Hill.

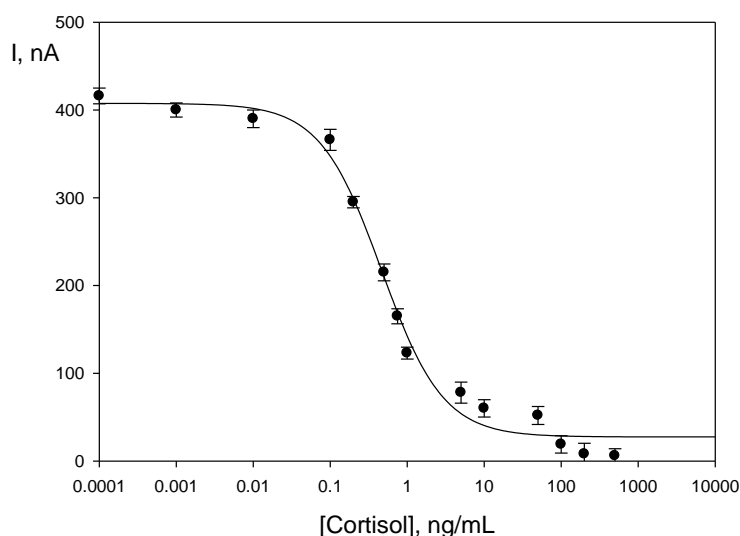


Figura 74.- Calibrado de cortisol obtenido por detección de 1-naftol sobre un electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ de tamaño micrométrico.

El intervalo lineal del calibrado se extiende entre 0.1 y 10.0 ng/mL ($r = 0.990$), siendo adecuado para la determinación de cortisol en muestras de suero y orina. Por otra parte, el límite de detección, calculado con el criterio $S/N = 3$, fue de 15 pg/mL, valor notablemente más bajo que el proporcionado por otros inmunosensores como, por ejemplo, el obtenido mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), 2000 pg/mL, por inmovilización covalente de anti-cortisol sobre una monocapa de ácido 11-

mercaptoundecanoico [Frasconi, 2009], o el alcanzado mediante un inmunoensayo ELISA colorimétrico no competitivo, basado en el empleo de conjugados cortisol-poli (L-Lys) y cortisol-HRP, 72 pg/mL [Anfossi, 2002].

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad del método se evaluó midiendo la respuesta voltamperométrica de 1-naftol sobre un mismo electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ usando cinco inmunoconjugados AP-cortisol-anti-cortisol-Protein A-MBs diferentes, preparados simultáneamente. La desviación estándar relativa de las medidas de la corriente de pico fue RSD = 6.5%. Paralelamente, se realizaron medidas sobre ocho electrodos diferentes, empleando también diferentes conjugados preparados en días distintos, obteniéndose un valor de RSD de 7.2%. Estos resultados ponen de manifiesto una buena reproducibilidad del procedimiento de fabricación de la matriz compósita y de la detección de 1-naftol sobre los electrodos resultantes.

5.2.3.4. Aplicación a la determinación de cortisol en orina y en suero humano

La metodología desarrollada para la determinación de cortisol se validó mediante aplicación al análisis de muestras certificadas de orina y de suero. En el caso de la orina, la muestra analizada, Liquichek urine chemistry control, de BioRad, contenía una concentración certificada comprendida entre 53.1 and 103 ng/mL. En primer lugar se obtuvieron calibrados por dilución de la muestra, con el fin de observar la existencia de efecto matriz. El valor medio de la pendiente de estos calibrados fue -148 ± 6 nA, que es un valor estadísticamente comparable a la de los patrones de cortisol, -151 ± 1 nA. Estos resultados pusieron de manifiesto la posibilidad de llevar a cabo la determinación de cortisol por interpolación de la señal electroquímica obtenida sobre el electrodo AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ en el calibrado de patrones.

Se analizaron muestras de orina sin diluir y diluida en proporción 10:1 y 100:1 en medio regulador Tris-HCl de pH 7.2, obteniéndose, respectivamente, los siguientes resultados: 59.1 ± 1.2 , 5.9 ± 0.5 y 0.61 ± 0.08 ng/mL de cortisol. Estos resultados

proporcionaron una concentración media de 59.7 ± 0.5 ng/mL de cortisol, valor que se encuentra dentro del intervalo de concentraciones certificado.

En el caso del suero, la muestra analizada contenía una concentración certificada de 277 ± 5 ng/mL de cortisol. Al igual que en el caso anterior, la determinación de la hormona se realizó por interpolación en el calibrado de patrones, ya que la pendiente de los calibrados de la muestra, -152 ± 1 nA, prácticamente coincide con el de dicho calibrado. La concentración media obtenida mediante análisis de muestras diluidas de suero fue de 270 ± 5 ng/mL de cortisol. La aplicación del test de la t de Student a este resultado proporcionó un valor de t_{exp} de 0.96, menor que el valor tabulado, 1.76, para un nivel de significación de 0.05, lo que demuestra que no existen diferencias significativas entre esta concentración y la certificada.

5.2.3.5. Conclusiones

Se ha desarrollado un dispositivo micrométrico basado en el material compuesto AuNPs/MWCNTs/OPPF₆, adecuado para la determinación voltamperométrica de cortisol, mediante un inmunoensayo realizado sobre partículas magnéticas. El pequeño tamaño de electrodo permite su aplicación al análisis de fluidos biológicos.

5.3. INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN ELECTRODOS DE SUPERFICIE MODIFICADA CON SALES DE DIAZONIO

Como se indicó en el Apdo. 3.2.4., la determinación de ACTH tiene un gran interés para la detección de distintos tipos de enfermedades, así como en medicina deportiva, ya que su administración estimula la producción de glucocorticoides. Por otro lado, la secreción de esta hormona está relacionada con la de cortisol, por lo que la determinación conjunta de ambas especies contribuye al diagnóstico de trastornos que cursan con deficiencia o exceso de alguna de ellas.

Al mismo tiempo, tal como se ha señalado, la inmovilización de las glicoproteínas por interacción con los derivados de ácido borónico constituye una alternativa muy interesante para la preparación de inmunosensores electroquímicos. En el caso de los anticuerpos, la región glicosilada se encuentra en la zona Fc, lo que permite, entre otras ventajas, una cierta orientación de estas biomoléculas. Una forma simple de fabricar superficies adecuadas para este tipo de inmovilización consiste en incorporar sales de diazonio unidas mediante “grafting” o injertado a los electrodos de carbono, seguida de la modificación covalente con el ácido borónico elegido.

En los trabajos que se describen a continuación se prepararon los primeros inmunosensores descritos en la bibliografía para la determinación de ACTH y para la determinación simultánea de ACTH y cortisol. Ambos están basados en la modificación de electrodos serigrafiados de carbono mediante enlaces C-C con ácido 4-aminobenzoico diazotado, y funcionalización posterior con ácido 3-aminofenilborónico. Esta estrategia permitió en ambos casos obtener configuraciones estables y de una elevada sensibilidad.

**5.3.1. INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO PARA
ADRENOCORTICOTROPINA BASADO EN ELECTRODOS
SERIGRAFIADOS MODIFICADOS CON ÁCIDO
FENILBORÓNICO**

5.3.1.1. Configuración del inmunosensor

En la Parte Experimental (Apdo. 4.7.3.) se describió el procedimiento seguido para la preparación de los electrodos modificados con ácido aminofenilborónico. Un esquema de este procedimiento, unido al de la configuración del inmunosensor para la determinación de ACTH, se ha representado en la Figura 75. Se siguió el procedimiento de Ho y col. [Ho, 2010] con ligeras modificaciones. Como puede observarse (Figura 75a), una vez que tiene lugar la reacción de diazotación del ácido 4-aminobenzoico (ABA), se deposita un pequeño volumen de la disolución sobre la superficie del electrodo y se aplican barridos de potencial en voltamperometría cíclica. Una vez modificado el electrodo, se activa el grupo carboxílico por reacción con los reactivos EDC y NHS, para posteriormente unir covalentemente el ácido 3-aminofenilborónico (APBA).

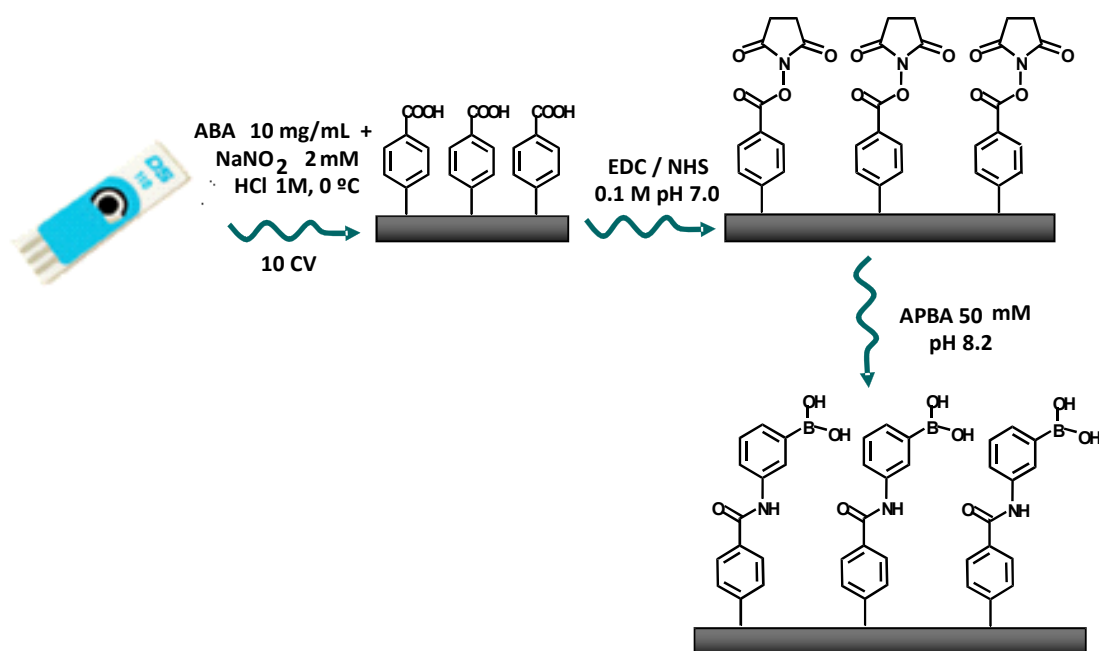


Figura 75a.- Esquema de la modificación del electrodo serigrafiado (SPCE) con ácido 3-aminofenilborónico (APBA).

Para la preparación del inmunosensor (Figura 75b), se inmoviliza anti-ACTH y se establece un esquema de ensayo competitivo con ACTH y Biotin-ACTH, añadiendo posteriormente AP-Strept, lo que da lugar a la formación del inmunoconjugado AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH/anti-ACTH/SPCE. La determinación de ACTH se realiza

añadiendo 1-naftilfosfato (1-NPP) y registrando la respuesta de oxidación del 1-naftol (1-NP), producto de la reacción enzimática, sobre la superficie del electrodo.

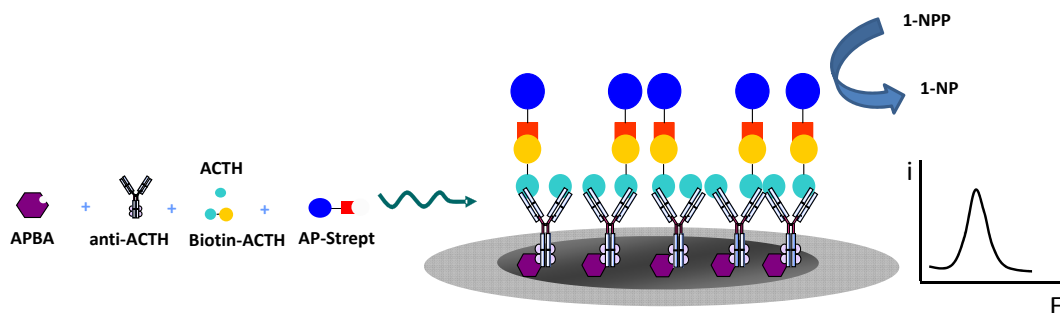


Figura 75b.- Esquema de la preparación y funcionamiento del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH/anti-ACTH/SPCE.

5.3.1.2. Caracterización de la superficie electródica

Tras la aplicación de las diferentes etapas de modificación, la superficie del electrodo se caracterizó empleando la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica. Los espectros de impedancias se obtuvieron depositando un volumen de 50 μL de una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ en concentración 5 mM de cada uno de ellos en medio KCl 0.1 M. Las medidas se realizaron aplicando una perturbación sinusoidal de 5 mV de amplitud sobre el potencial a circuito abierto, obteniendo los valores de impedancia a 100 frecuencias armónicas en el intervalo comprendido entre 100 mHz y 10 kHz (20 frecuencias por década). Para cada frecuencia se tomó el valor medio de la impedancia obtenida en cinco medidas.

Como puede observarse en la Figura 76, la modificación del electrodo serigrafiado con ácido 4-aminobenzoico dificulta considerablemente la transferencia electrónica, lo que se pone de manifiesto en el aumento del diámetro del semicírculo del espectro de impedancias ($R_{tc} = 3050 \Omega$) en comparación con el correspondiente al electrodo sin modificar. Este hecho se atribuye a la repulsión electrostática entre los grupos carboxilato de la superficie, cargados negativamente, y los aniones ferro y ferricianuro presentes en la disolución. Por otro lado, después de la activación de los grupos carboxílicos con EDC/NHS y la incorporación del grupo fenilborónico por formación del enlace amida, se produce un dramático descenso en la resistencia a la

transferencia de carga ($R_{tc} = 307 \, \Omega$) como consecuencia de la neutralización de la carga negativa superficial.

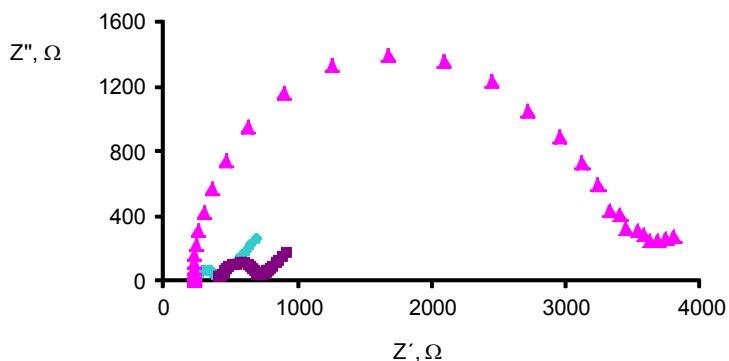


Figura 76.- Diagramas de Nyquist de: (●) SPCE, (▲) SPCE modificado con ABA, (■) SPCE modificado con ABA y APBA; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M.

El comportamiento observado concuerda con los resultados obtenidos mediante voltamperometría cíclica. Así, tal como se observa en la Figura 77, los voltamperogramas cíclicos de la disolución $\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M obtenidos sobre el electrodo modificado con ABA presentan valores de la corriente de oxidación y reducción considerablemente menores que los obtenidos para el electrodo sin modificar, al tiempo que aumenta la separación entre los potenciales de pico. Sin embargo, la reversibilidad y la corriente se incrementan tras la incorporación de APBA como consecuencia de la neutralización de la carga negativa.

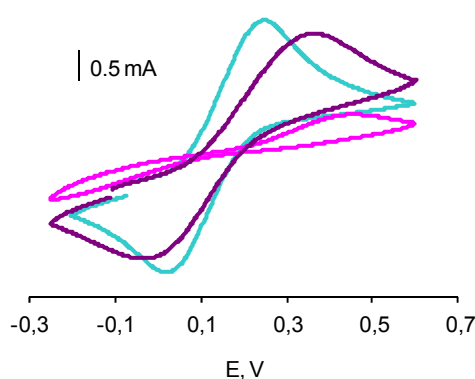


Figura 77.- Voltamperogramas cíclicos de: (—) SPCE, (—) SPCE modificado con ABA, (—) SPCE modificado con ABA y APBA; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M.

5.3.1.3. Optimización de las variables experimentales

Como en los casos anteriores, se han optimizado las distintas variables experimentales relacionadas con la preparación del inmunosensor, la realización del inmunoensayo y detección de ACTH. Las medidas se realizaron mediante voltamperometría diferencial de impulsos, utilizando como sustrato de la enzima fosfatasa alcalina, el 1- naftilfosfato.

Influencia de la concentración de anti-adrenocorticotropina

Una vez modificada la superficie electródica, se estudió la influencia de la concentración de la disolución de anticuerpo en el intervalo de concentraciones de 5 a 30 $\mu\text{g/mL}$. Dicho estudio se llevó a cabo incubando el electrodo en dicha disolución durante toda la noche a 4 °C, empleando disoluciones de Biotin-ACTH de 1 $\mu\text{g/mL}$, en ausencia de ACTH y AP-Strept de 2 $\mu\text{g/mL}$. Como se observa en la Figura 78, al aumentar la concentración de anticuerpo aumenta la corriente de pico hasta 30 $\mu\text{g/mL}$, manteniéndose prácticamente constante a partir de dicho valor.

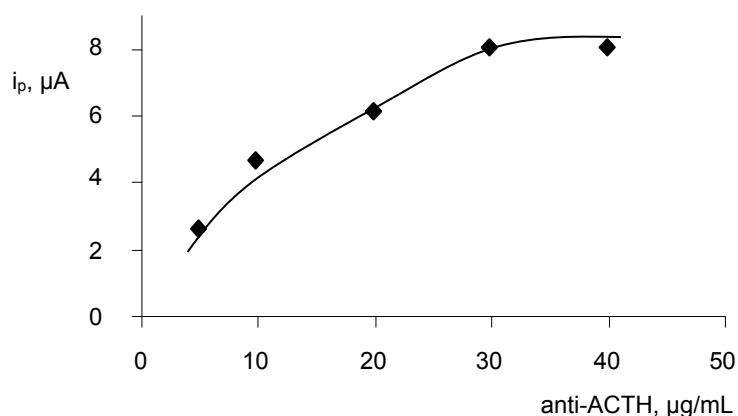


Figura 78.- Influencia de la concentración de anticuerpo sobre la corriente de pico en DPV. Biotin-ACTH, 1 $\mu\text{g/mL}$ y AP-Strept, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1-NPP 0.005 M en medio Trizma de pH 9.0.

En la Figura 79 se observa que la diferencia de corriente de pico en presencia y ausencia de Biotin-ACTH aumenta con la concentración de anticuerpo hasta 30 $\mu\text{g/mL}$, estabilizándose para concentraciones superiores. Por tanto, se ha elegido este valor para posteriores estudios.

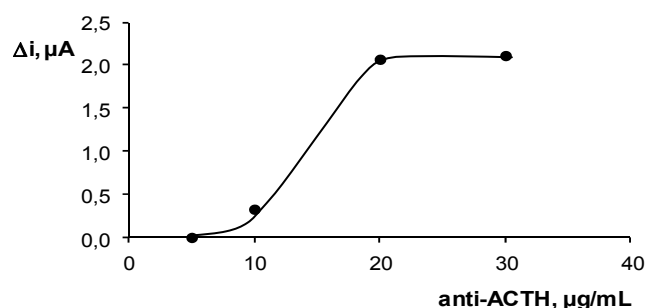


Figura 79.- Influencia de la concentración de anticuerpo sobre la diferencia de corriente de pico en DPV en ausencia y en presencia de Biotin-ACTH, 1 µg/mL y AP-Strept, 2 µg/mL, 1-NPP 0.005 M en medio Trizma de pH 9.0.

Optimización de la concentración de BSA y del tiempo de incubación

Para evitar adsorciones inespecíficas de la ACTH-biotinilada sobre la superficie del electrodo, se incluyó una etapa de bloqueo de dicha superficie. Para ello, se incubó el electrodo, en ausencia y presencia de anticuerpo, en 10 µL de una disolución de BSA del 1, 2 y 5%, durante 30, 60 y 120 minutos, empleando Biotin-ACTH de 1000 ng/mL y AP-Strept de 2000 ng/mL. A partir de los resultados obtenidos, se eligió un porcentaje del 2% de BSA y un tiempo de incubación de 1 h. Bajo esas condiciones, tal como se observa en la Figura 80, se obtiene una señal inespecífica inferior al 10% de la señal correspondiente al inmunosensor.

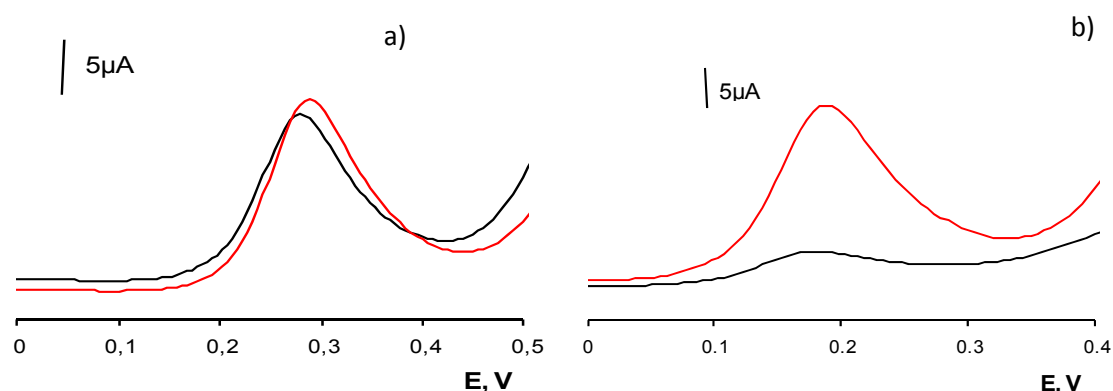


Figura 80.- Voltamperogramas DPV de AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE (—) y AP-Strept-Biotin-ACTH-APBA/SPCE (—): a) sin etapa de bloqueo y b) bloqueo con 2% de BSA tras la inmovilización del anticuerpo de captura.

Influencia de la concentración y tiempo de incubación de Biotin-ACTH

Otra de las variables optimizadas fue la concentración de Biotin-ACTH necesaria para saturar todos los sitios de unión del anticuerpo primario. Para ello se prepararon distintos inmunosensores anti-ACTH-APBA/SPCE con 30 $\mu\text{g/mL}$ de anti-ACTH y 2 $\mu\text{g/mL}$ de AP-Strept, empleándose disoluciones de Biotin-ACTH en el intervalo de concentración comprendido entre 0 y 1500 ng/mL. Los valores de intensidad de pico obtenidos en ausencia de ACTH se muestran en la Figura 81. Como puede observarse, la corriente aumenta drásticamente hasta 750 ng/mL, disminuyendo ligeramente para concentraciones superiores, por lo que se escogió este valor como óptimo para estudios posteriores.

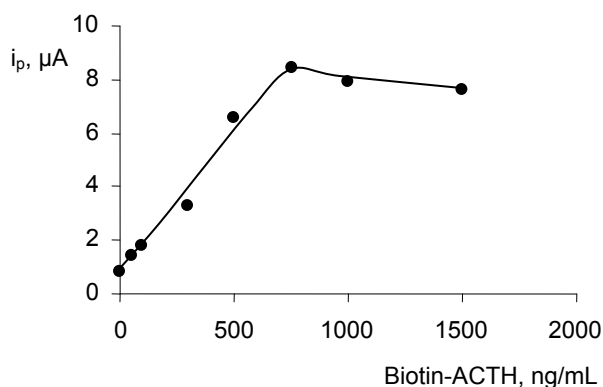


Figura 81.- Influencia de la concentración de Biotin-ACTH sobre la corriente de pico en DPV; 30 $\mu\text{g/mL}$ anti-ACTH; 2 $\mu\text{g/mL}$ AP-Strept; 1-NPP 0.005 M en medio Trizma de pH 9.0.

En relación al tiempo, se prepararon inmunosensores en las condiciones optimizadas anteriormente, llevando a cabo el inmunoensayo competitivo por incubación del electrodo durante diferentes periodos en una mezcla de 1 ng/mL de ACTH y de Biotin-ACTH de concentración variable. En la Figura 82 se ha representado la variación del incremento de corriente de pico en DPV obtenida para inmunosensores preparados en presencia y en ausencia de ACTH. Como puede observarse, al aumentar el tiempo de incubación, entre 15 y 45 minutos, aumenta la diferencia de corriente, lo que implica que aumenta la cantidad de Biotin-ACTH unido al anticuerpo. Sin embargo, para tiempos más prolongados, el incremento de señal comienza a disminuir, lo que se debe probablemente a que la ACTH biotinilada va desplazando a la hormona libre.

Asimismo, se estudió el efecto de la temperatura de incubación, preparando inmunosensores preparados a distintas temperaturas, 4, 20 y 38 °C, observándose que tanto la corriente de pico como la reproducibilidad decrecen a medida que aumenta la temperatura, debido a la baja estabilidad de la hormona ACTH [Talbot, 2003]. Por tanto, se seleccionó una temperatura de incubación de 4°C.

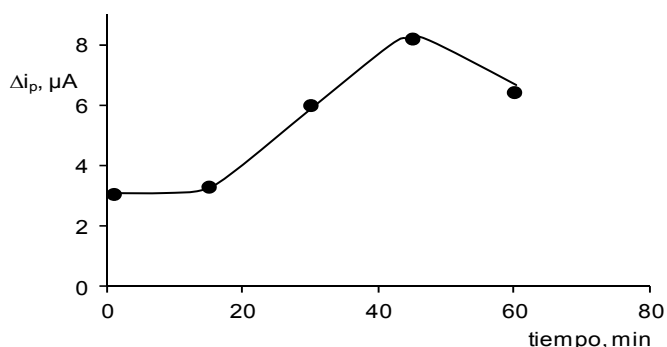


Figura 82.- Influencia del tiempo de incubación en una mezcla de ACTH y Biotin-ACTH sobre la corriente de pico del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Influencia de la concentración de AP-Strept y del tiempo de incubación.

Se estudió la respuesta voltamperométrica del inmunosensor preparado en ausencia de ACTH libre, empleando AP-Strept de diferentes concentraciones comprendidas en el intervalo de 0 a 2000 ng/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 83, observándose un aumento de corriente hasta 1500 ng/mL del conjugado, y estabilizándose para concentraciones superiores, lo que sugiere la saturación de las moléculas de Biotin-ACTH con la estreptavidina marcada. Estos resultados permiten sugerir que la detección óptima de la competición entre el ACTH y el ACTH biotinilado por los sitios de unión del anticuerpo tiene lugar para una concentración de AP-Strept de 2000 ng/mL.

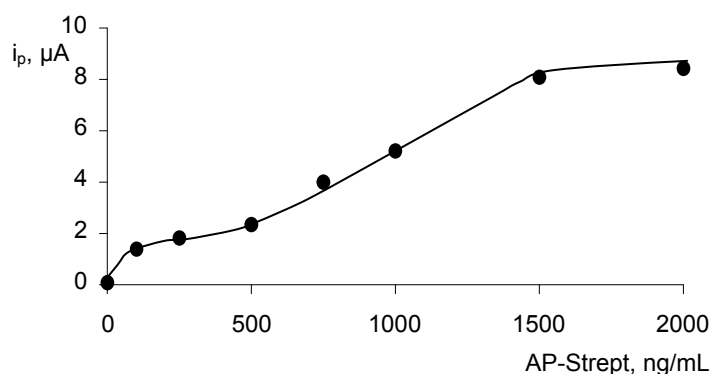


Figura 83.- Influencia de la concentración de AP-Strept sobre la corriente de pico del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Finalmente, se estudió el tiempo de incubación en la disolución de AP-Strept en el intervalo de 0 a 60 minutos. Los resultados que aparecen en la Figura 84 muestran un rápido aumento de la señal de corriente hasta 30 minutos, tendiendo a estabilizarse la señal para tiempos superiores. El tiempo de incubación elegido fue de 60 minutos.

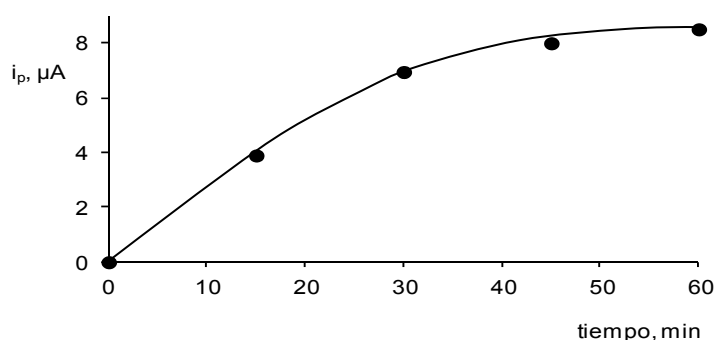


Figura 84.- Influencia del tiempo de incubación en la disolución de AP-Strept sobre la corriente de pico del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Elección del sustrato de la enzima fosfatasa alcalina

Con el fin de seleccionar el sustrato de la fosfatasa alcalina más apropiado para llevar a cabo la determinación de ACTH, se estudió el comportamiento electroquímico sobre el electrodo utilizado, de distintos compuestos fenólicos: indoxil, 4-aminofenol y 1-naftol, generados como productos de hidrólisis de la reacción enzimática de los respectivos derivados fosfato: indoxilfosfato, 4-aminofenilfosfato y 1-naftilfosfato.

En la Figura 85 se muestran los voltamperogramas en DPV obtenidos en medio regulador Trizma de pH 9.0. El voltamperograma correspondiente al empleo de 4-aminofenilfosfato como sustrato enzimático muestra dos señales de oxidación, la del fenol generado en la reacción enzimática, que aparece a menor potencial (-0.063 V) y la del propio sustrato (0.465 V). Por otro lado, el 1-naftol generado en la reacción enzimática por parte del 1-naftilfosfato presenta un pico de menor intensidad que el correspondiente al indoxilo, formado a partir del indoxilfosfato. Sin embargo, el potencial de pico, en 0.412 V es mucho más positivo, y por ello se escogió 1-naftilfosfato como sustrato enzimático.

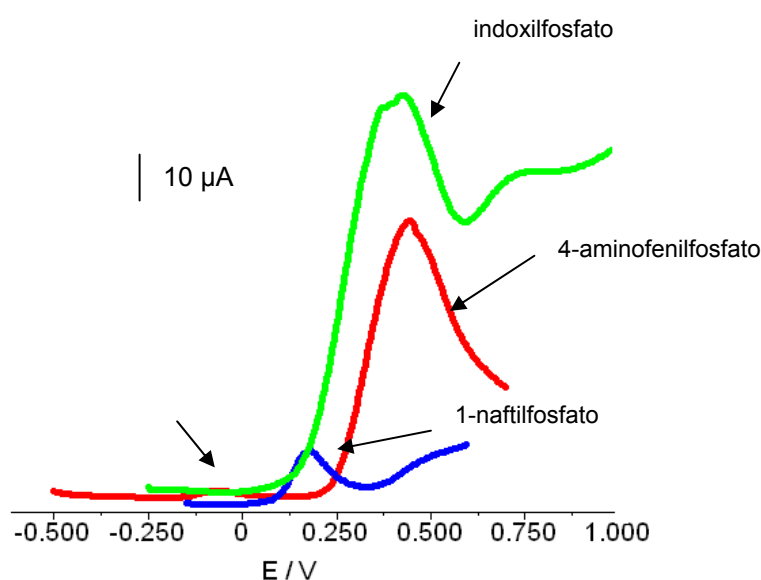


Figura 85.- Voltamperogramas del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE empleando distintos sustratos de la enzima AP; medio Trizma 0.1 M de pH 9.0.

Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato y del tiempo de hidrólisis

Tras la elección de 1-naftilfosfato como sustrato enzimático, se estudió la influencia de su concentración sobre la respuesta voltamperométrica de oxidación en diferencial de impulsos registrada en el intervalo de -0.15 a 0.60 V empleando los inmunosensores preparados en las condiciones optimizadas. Los resultados que aparecen en la Figura 86 muestran un aumento de la corriente de pico a medida que se incrementa la concentración de sustrato hasta 0.005 M. A partir de ese valor, la señal disminuye drásticamente lo que puede atribuirse a un ensuciamiento de la

superficie electródica por la elevada concentración de 1-naftol generado en la reacción enzimática y/o a la pérdida de actividad enzimática producida por la saturación de la enzima. Con el fin de obtener la máxima sensibilidad, se eligió una concentración de sustrato 5 mM, la cual es lo suficientemente elevada para asegurar que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de la enzima fosfatasa alcalina sobre la superficie del electrodo.

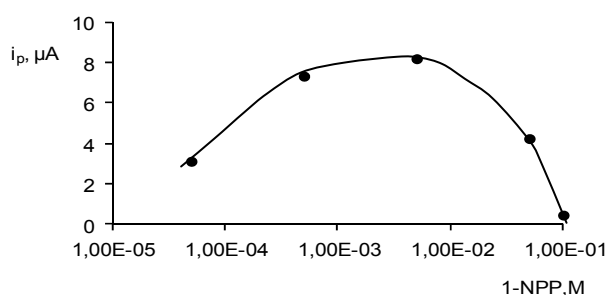


Figura 86.- Influencia de la concentración de 1-NPP sobre la corriente de pico en DPV con el inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Finalmente, se optimizó el tiempo necesario para que tenga lugar la hidrólisis del sustrato, 1-NPP, en el intervalo comprendido entre 1 y 15 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 87, observándose cómo la respuesta voltamperométrica aumenta con el tiempo hasta llegar a 8 minutos; a partir de 10 minutos la señal disminuye. Como solución de compromiso entre una buena sensibilidad y un corto tiempo de análisis, se escogió un intervalo de ocho minutos como valor óptimo.

A modo de resumen, en la Tabla 12 se resumen las variables optimizadas, los intervalos estudiados, así como el valor elegido en cada caso.

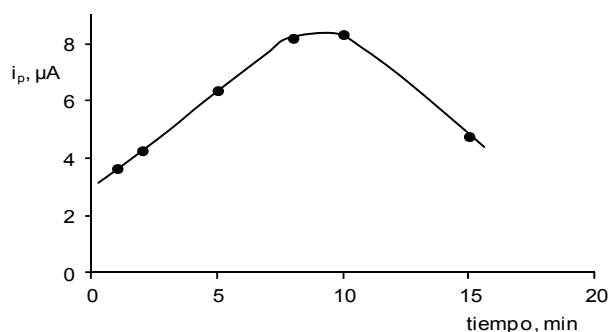


Figura 87.- Influencia del tiempo de hidrólisis de 1-NPP sobre la corriente de pico en DPV con el inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Tabla 12.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE para la determinación de ACTH.

Variable experimental	Rango estudiado	Valor seleccionado
anti-ACTH, $\mu\text{g/mL}$	5 - 30	30
BSA, %	1 - 5	2
t_{BSA} , min	30 - 120	60
Biotin-ACTH, ng/mL	0 - 1500	750
tiempo de competición, min	0 - 60	45
AP-Strept, $\mu\text{g/mL}$	0 - 2000	2000
tiempo de incubación, min	0 - 60	60
1-naftilfosfato, M	$5 \cdot 10^{-5}$ - 0.1	0.005
tiempo de hidrólisis, min	0 - 60	8

5.3.1.4. Calibrado y características analíticas

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas anteriormente y empleando la voltamperometría de diferencial de impulsos como técnica de medida, se obtuvo el calibrado para ACTH que se ha representado en la Figura 88. Este presenta el hábito típico de los formatos competitivos, en el que el analito ACTH y el analito marcado con fosfatasa alcalina compiten por los sitios de unión del anticuerpo

inmovilizado. Se han medido los valores de intensidad de pico en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10^{-3} y 500 pg/mL, ajustándose la curva obtenida a la ecuación paramétrica de los formatos competitivos ($r = 0.995$). El valor de EC_{50} fue 0.10 ± 0.02 ng/L y la pendiente de Hill, -1.16 ± 0.15 . El intervalo lineal abarca desde 0.025 a 1.0 pg/mL ($r = 0.990$), siendo adecuado para la determinación de ACTH en muestras clínicas. Finalmente, el límite de detección alcanzado fue de 18.2 pg/L.

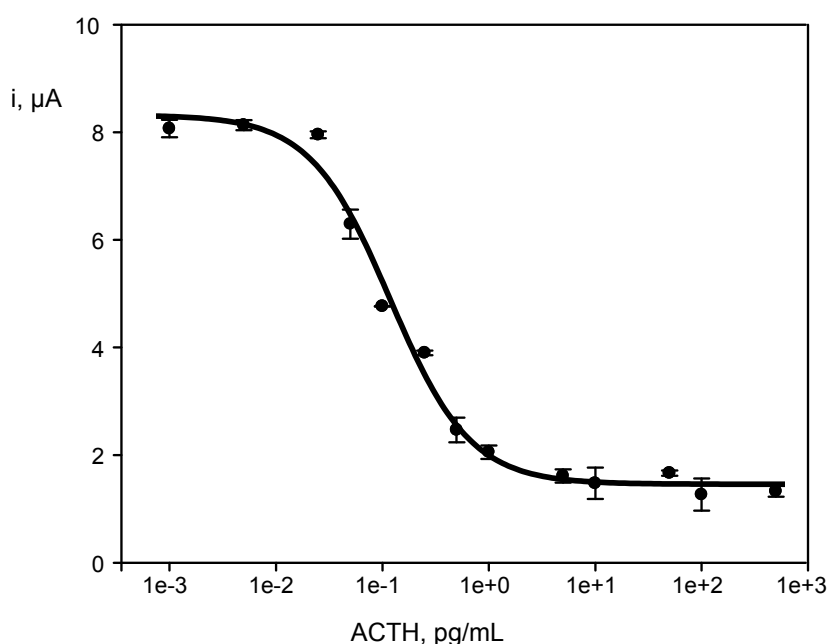


Figura 88.- Calibrado de ACTH obtenido con el inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

A modo de ejemplo, en la Figura 89 se muestran los voltamperogramas en DPV correspondientes a disoluciones de 0, 0.05, 0.50 y 1.00 pg/mL de ACTH. Como ya se ha comentado, la señal de corriente disminuye a medida que aumenta la concentración de ACTH. En dicha Figura puede apreciarse que existen diferencias significativas entre la señal correspondiente a una concentración tan baja de ACTH como 0.05 pg/mL y la obtenida en ausencia de ACTH.

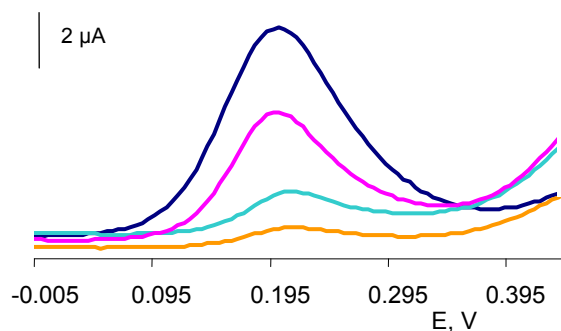


Figura 89.- Voltamperogramas en DPV correspondientes a inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE para ACTH: — 0, — 0.05, — 0.5, y — 1ng/mL.

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

La reproducibilidad de la respuesta voltamperométrica del inmunosensor se evaluó preparando ocho inmunosensores en ausencia de ACTH y en presencia de la hormona en concentración 0.1 pg/mL (correspondiente al punto EC_{50}). Los valores de RSD fueron de 3.3% y 4.4%, respectivamente, para ensayos realizados el mismo día, mientras que para medidas realizadas en diferentes días, los valores de RSD obtenidos fueron de 8.9% y 5.9% en ausencia de ACTH y para una concentración de ACTH de 0.1 pg/mL respectivamente. Estos datos demuestran que el procedimiento de fabricación del inmunosensor es reproducible.

Por otro lado, también se evaluó la estabilidad de la modificación del electrodo con APBA, con anti-ACTH-APBA/SPCE, así como la del inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE completo. Para ello, se prepararon diferentes electrodos modificados e inmunosensores el mismo día y se almacenaron en nevera a 4 °C. Cada día se construyó el inmunosensor completo haciendo uso de los electrodos modificados APBA/SPCE y anti-ACTH-APBA/SPCE, y se midió la respuesta voltamperométrica del 1-NPP en ausencia de ACTH. La Figura 90 muestra los resultados obtenidos durante un periodo de 27 días, representando cada punto a la media de tres medidas sucesivas. Como puede observarse, los electrodos modificados con APBA (●) presentan una respuesta que permanece dentro de los límites $\pm 3s$ correspondiente a la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día de trabajo ($n = 10$), durante al menos 18 días, manteniendo el día 27 el 63% de la señal

inicial. Respecto a las medidas realizadas preparando el inmunosensor empleando los electrodos modificados anti-ACTH-APBA/SPCE (○), puede observarse que la corriente obtenida permanece dentro de los límites del gráfico de control durante 15 días, siendo la señal obtenida el último día un 83% de la corriente inicial. En el caso del inmunosensor completo, la estabilidad de almacenamiento fue mucho menor, ya que después de 5 días se obtenía el 70% del valor inicial de la señal.

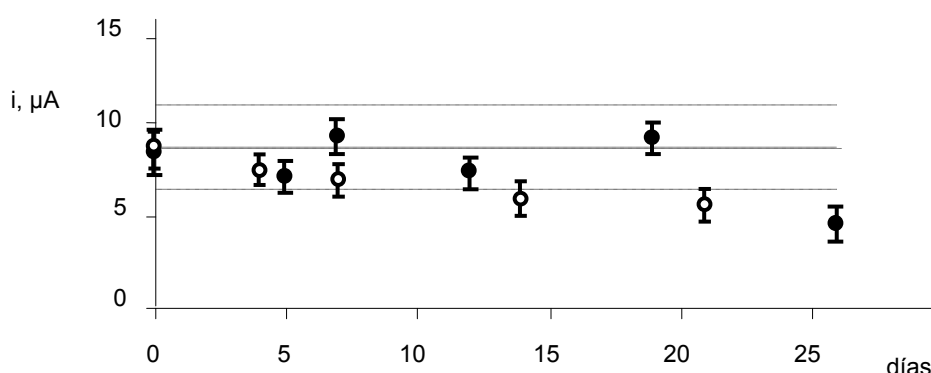


Figura 90.- Gráfico de control para SPCE/APBA (●) y SPCE/APBA/anti-ACTH (○). Cada punto es la medida de tres medidas sucesivas en una disolución de 1-NPP 5 mM.

5.3.1.5. Estudios de reactividad cruzada

Se ha estudiado el efecto de la presencia de otros compuestos que pueden estar presentes en las muestras biológicas junto al ACTH, sobre la respuesta del inmunosensor desarrollado. Las especies investigadas fueron: cortisol, hGH, progesterona, prolactina, testosterona y 17 β -estradiol (ver estructuras químicas en las Figuras 2,5 y 19). Para ello, se calculó la reactividad cruzada en cada caso a partir del valor de EC_{50} obtenido a partir de los calibrados de los compuestos investigados, representados en la Figura 91. Como puede observarse en la Tabla 13, todas las especies investigadas presentan valores muy bajos de % CR, inferiores al 0.01%, excepto el cortisol, 0.02%. Estos resultados demuestran la alta selectividad del inmunosensor desarrollado y pone de manifiesto la elevada especificidad del anticuerpo de la ACTH.

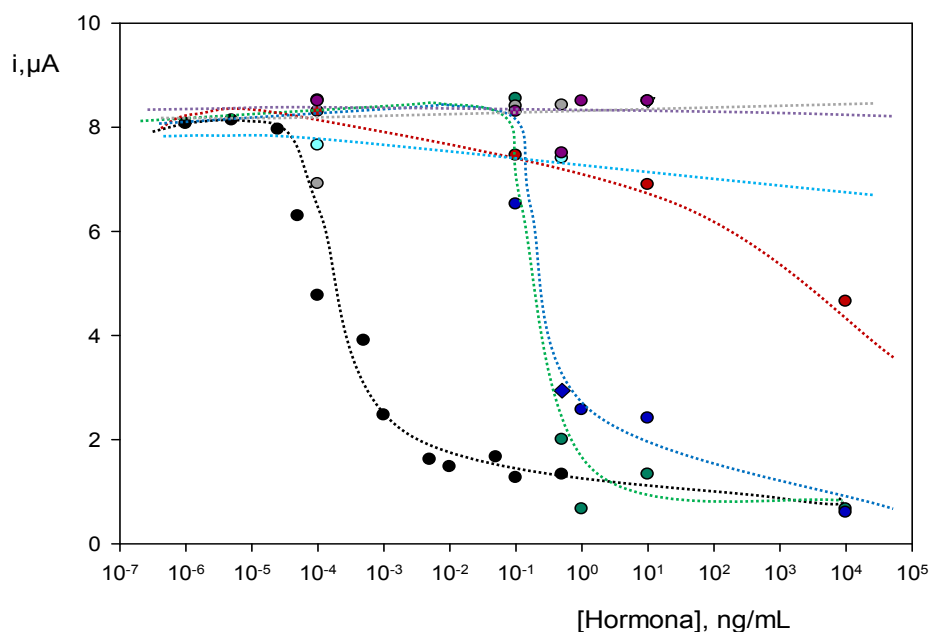


Figura 91.- Calibrados de: (●) ACTH, (●) cortisol, (●) progesterona, (●) prolactina, (●) testosterona, (●) estradiol, (●) hGH.

Tabla 13.-Reactividad cruzada calculada a partir de los valores de EC_{50} para diferentes hormonas obtenidos con el inmunosensor AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Compuesto	EC_{50} , ng/mL	CR*, %
ACTH	1.0×10^{-4}	100
Cortisol	0.47	0.02
Prolactina	1.11	0.01
Estradiol	13733	7.3×10^{-7}
Testosterona	>20000	$<5.0 \times 10^{-7}$
Progesterona	>20000	$<5.0 \times 10^{-7}$
hGH	>20000	$<5.0 \times 10^{-7}$

$$*\%CR = 100 (EC_{50}) ACTH / (EC_{50}) \text{ interferente}$$

5.3.1.6. Aplicación a la determinación de ACTH en suero humano

La utilidad del inmunosensor para el análisis de muestras reales se demostró por aplicación a una muestra de suero humano certificada que contenía una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de la hormona. Para ello, en primer lugar se obtuvo un calibrado por dilución de la muestra de suero reconstituida, con los resultados que se han representado en la Figura 92. Como puede observarse, los puntos de la muestra se ajustan bien al calibrado de patrones, presentando la recta ($r = 0.997$) una pendiente de $-1.54 \pm 0.05 \mu\text{A}$, valor muy similar a la obtenida para la porción lineal del calibrado de patrones de ACTH: $-1.52 \pm 0.01 \mu\text{A}$. Estos resultados ponen de manifiesto la ausencia de efecto matriz, por lo que la determinación de ACTH en la muestra de suero puede llevarse a cabo por interpolación de la corriente en el calibrado externo.

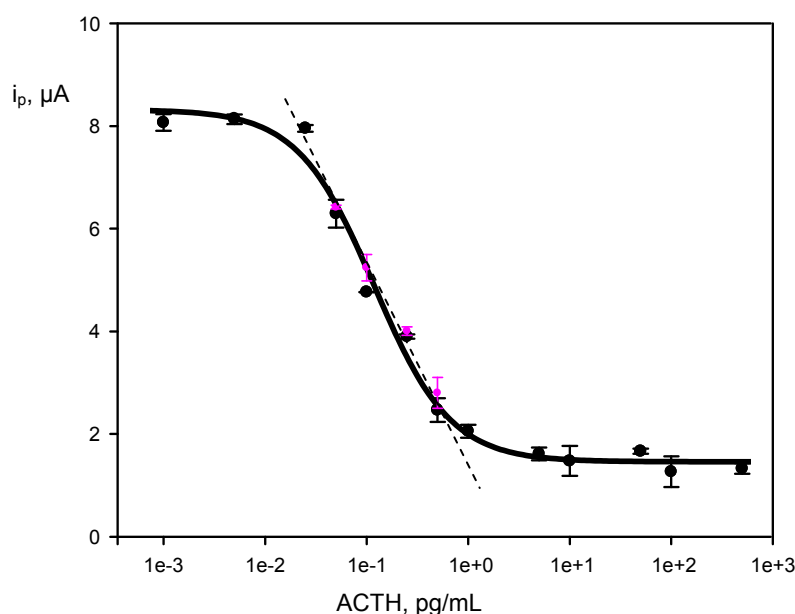


Figura 92.- Muestras de suero (●) y calibrado de patrones de ACTH (●).

Empleando dicha estrategia, se analizaron las muestras de suero con los resultados que se han resumido en la Tabla 14. Como puede observarse, se obtienen buenos niveles de recuperación a los diferentes niveles de concentración de ACTH ensayados. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad del inmunosensor desarrollado para el análisis de bajas concentraciones de adrenocorticotropina

presentes en suero humano sin necesidad de aplicar prácticamente ningún tratamiento a la muestra.

Tabla 14.- Determinación de ACTH en suero humano.

ACTH, pg/mL	ACTH encontrada, pg/mL	Recuperación, %
0.0500	0.050 ± 0.001	101 ± 3
0.100	0.11 ± 0.02	106 ± 4
0.25	0.23 ± 0.02	92 ± 3
0.50	0.49 ± 0.015	98 ± 5

5.3.1.7. Conclusiones

El inmunosensor desarrollado para la determinación de ACTH, por inmovilización de anti-ACTH sobre un electrodo serigrafiado modificado con un derivado de ácido borónico, constituye el primer diseño de inmunosensor electroquímico descrito en la bibliografía y presenta unas excelentes características analíticas en términos de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. Además, permite la cuantificación de ACTH en un amplio intervalo de concentraciones, y compite favorablemente, en términos de intervalo de linealidad y límite de detección con otros inmunosensores e inmunoensayos descritos en la literatura. Finalmente, se ha demostrado su utilidad por aplicación a muestras reales de suero certificadas.

**5.3.2. INMUNOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN
UN ELECTRODO DUAL MODIFICADO CON ÁCIDO
FENILBORÓNICO PARA LA DETERMINACIÓN
SIMULTÁNEA DE ADRENOCORTICOTROPINA Y CORTISOL**

5.3.2.1. Configuración del inmunosensor

En la Figura 93 se ha representado la configuración del inmunosensor múltiple desarrollado para la determinación simultánea de ACTH y cortisol. La preparación de las dos superficies sensoras del electrodo serigrafiado dual se realiza del mismo modo que se describió en el Apdo. 4.7.3. y que se ha resumido en el capítulo anterior. Una vez unido covalentemente el ácido 3-aminofenilborónico (APBA), se procedió a la preparación de los inmunosensores, incorporando los anticuerpos anti-ACTH y anti-cortisol a las superficies SPCE1 y SPCE2, respectivamente. En ambos casos se diseñó un esquema de inmunoensayo competitivo, empleando el mismo que se había puesto a punto anteriormente, para ACTH, mientras que para la determinación de cortisol, el ensayo se basó en la competencia entre el analito y el analito marcado con fosfatasa alcalina por los puntos de unión del anticuerpo. Una vez preparados los dos inmunosensores, la determinación de las hormonas se realizó añadiendo 1-NPP y registrando la respuesta en DPV del 1-naftol formado en cada superficie.

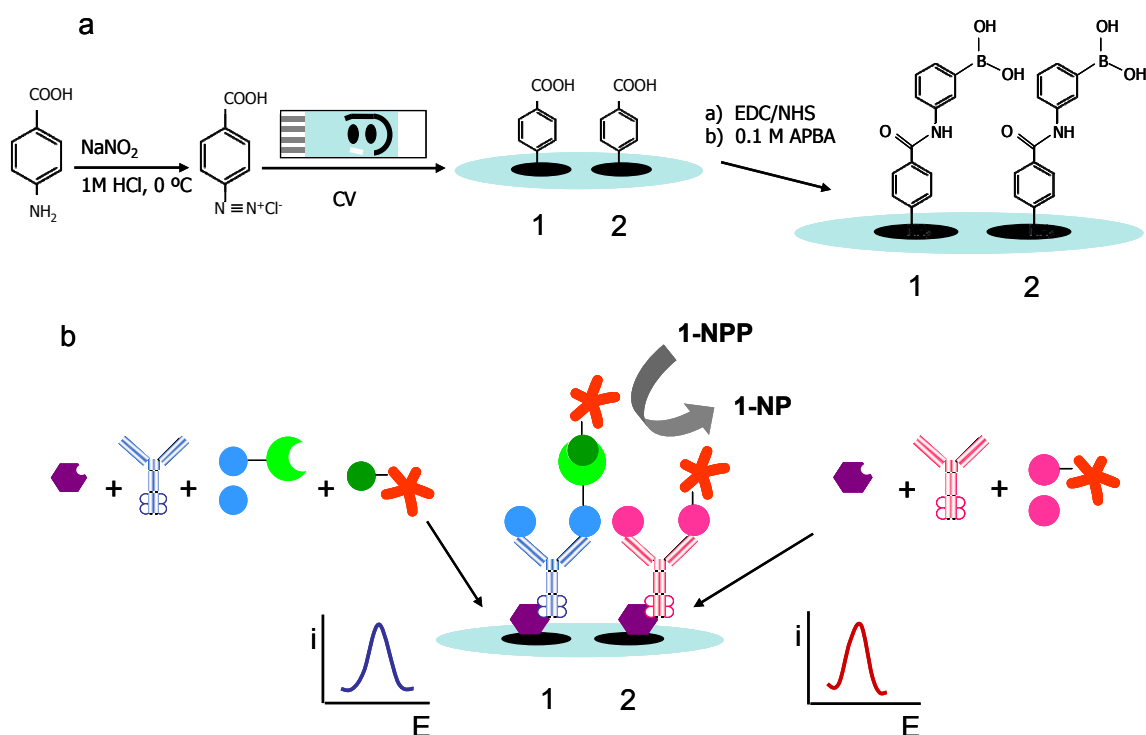


Figura 93.- Esquema de la preparación y funcionamiento del inmunosensor dual AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 y AP-cortisol/cortisol/anti-cortisol/APBA/SPCE2.

5.3.2.2. Caracterización de las superficies electródicas

Para caracterizar las superficies SPCE1 y SPCE2 tras la aplicación de las etapas sucesivas de modificación, se registraron voltamperogramas cíclicos empleando una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mM y 0.1 M en KCl. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura 94. Como puede observarse, las respuestas fueron similares sobre ambos electrodos y coincidentes con lo observado en el capítulo anterior para el ACTH mediante espectroscopía de impedancia electroquímica y voltamperometría cíclica. La modificación con ácido 4-aminobenzoico produce una fuerte disminución de la corriente respecto a la de los electrodos sin modificar, debido a la repulsión electrostática entre los grupos carboxilato superficiales y las especies redox aniónicas presentes en la disolución. Después, tras la activación con EDC/NHS y unión covalente con ácido 3-aminofenilborónico, se aprecia un incremento de la respuesta voltamperométrica como consecuencia de la neutralización de la carga negativa de la superficie del electrodo. Por último, la inmovilización de los anticuerpos anti-ACTH y anti-cortisol (voltamperogramas 5 y 5') da lugar a una disminución de la corriente, mucho más acentuada en el caso del anti-ACTH. Este hecho pone de manifiesto la diferencia entre la cantidad inmovilizada de cada uno de los anticuerpos, así como sus distintas características.

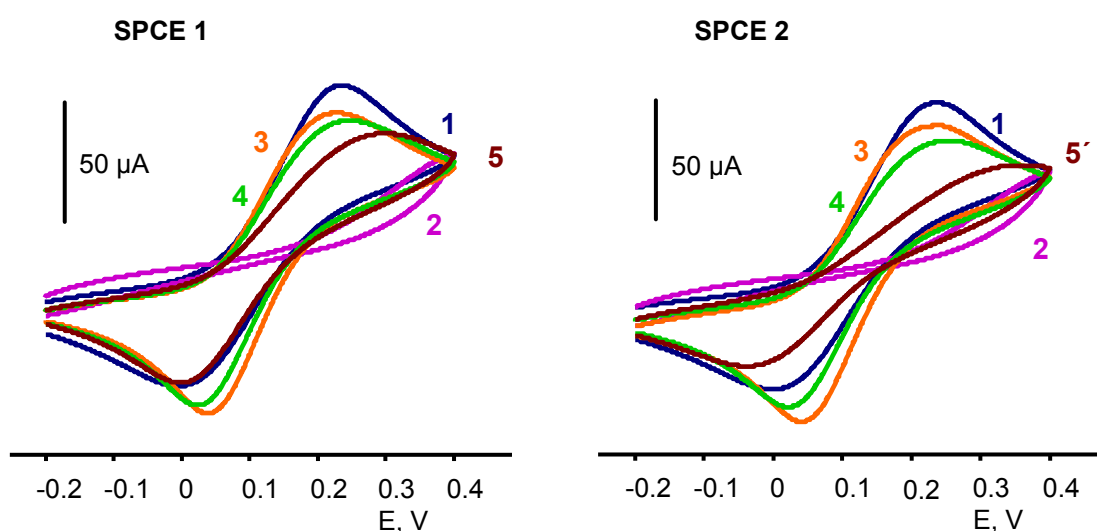


Figura 94.- Voltamperogramas cíclicos de (—) SPCE, (—) SPCE-ABA; (—) SPCE-ABA_{activado}; (—) SPCE-APBA; (— 5) SPCE-APBA-antiACTH; (— 5') SPCE-APBA-anticortisol. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mM en KCl 0.1 M. $v = 10 \text{ mV/s}$.

5.3.2.3. Optimización de las variables experimentales

Para optimizar las distintas variables experimentales que afectan a la preparación y el funcionamiento del inmunosensor dual, se ha utilizado 1-NPP como sustrato de la enzima fosfatasa alcalina y voltamperometría diferencial de impulsos como técnica de medida. Al igual que en otras configuraciones, el objetivo ha sido el de alcanzar la mayor sensibilidad y el intervalo de linealidad más amplio para la determinación de ACTH y cortisol.

Influencia de la cantidad de anticuerpo inmovilizado

Como se ha señalado, para la preparación de los inmunoconjugados, los correspondientes anticuerpos se inmovilizaron sobre los electrodos modificados con el ácido 3-aminofenilborónico. Dado que la superficie activa de los electrodos SPCE1 y SPCE2 (5.6 mm^2) es inferior a la del electrodo serigrafiado empleado para la determinación individual de ACTH (12.56 mm^2) fue necesario disminuir el volumen de la disolución de los anticuerpos de 10 a $4 \text{ }\mu\text{L}$, con el fin de no contaminar los inmunosensores de ACTH y cortisol con el anticuerpo del otro.

Los ensayos se llevaron a cabo midiendo las respuestas en voltamperometría diferencial de impulsos de diferentes inmunosensores duales preparados en ausencia de hormonas, cortisol y ACTH, variando la concentración de anti-cortisol y anti-ACTH, respectivamente, en el intervalo de 0 a $80 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Se emplearon también disoluciones de Biotin-ACTH de $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ y de AP-cortisol de $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para cada inmunosensor y AP-Strept de $2 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Tal como se observa en la Figura 95, al aumentar la concentración de anticuerpo aumenta la señal analítica medida, siendo este aumento mucho más lento para concentraciones de $30 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de anti-ACTH y de $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para el anti-cortisol. Por tanto, estas concentraciones fueron seleccionadas para posteriores estudios. Por otra parte, se estudió el tiempo de incubación de los anticuerpos sobre la superficie de los electrodos, apreciándose los mejores resultados cuando estos se mantenían durante toda la noche.

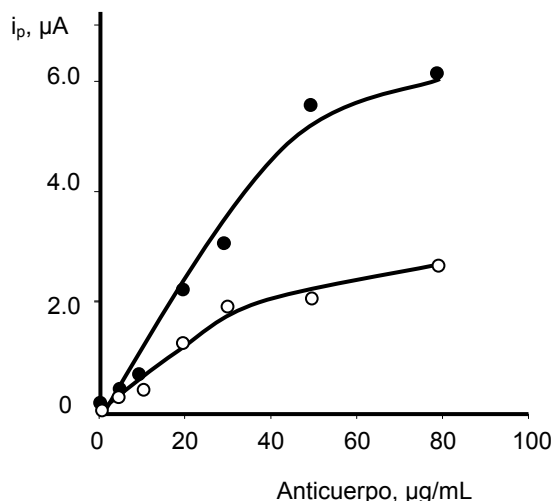


Figura 95.- Optimización de la cantidad de anticuerpo para los inmunosensores de ACTH (○) y de cortisol (●).

Influencia de la cantidad de BSA y tiempo de incubación

Para evitar en lo posible las uniones inespecíficas de los distintos inmunorreactivos sobre la superficie de los electrodos, se llevó a un bloqueo con BSA una vez inmovilizados los anticuerpos. Primeramente se hizo un ensayo empleando la etapa de bloqueo optimizada anteriormente para el inmunosensor de ACTH, consistente en incubar el electrodo, tras la inmovilización de los anticuerpos, en una disolución de BSA del 2% durante 1 h. En estas condiciones, en el inmunosensor para ACTH, la respuesta inespecífica de la AP-Strept siempre fue inferior al 10% de la señal obtenida para el inmunosensor preparado en ausencia de ACTH (AP-Strept/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE). Sin embargo, bloqueando de igual modo en el caso del cortisol, la señal atribuida a uniones inespecíficas fue mucho mayor. Así, fue necesario probar otras alternativas que se aplicaron únicamente al inmunosensor de cortisol empleando electrodos serigrafiados convencionales (no duales). Estas consistieron en aumentar el tiempo de incubación e incluir BSA en la disolución de AP-cortisol.

En la Figura 96 se muestran los voltamperogramas correspondientes a un electrodo modificado con AP-cortisol sin bloqueo con BSA (curva 1), así como los obtenidos incluyendo una etapa de incubación en BSA al 2% durante distintos tiempos (curvas 2 y 3). Los voltamperogramas 4 y 5 se realizaron incluyendo un 2% de BSA en la disolución de AP-cortisol, con la diferencia de que la curva 5 incluye además la etapa

previa de 1 h de incubación en BSA 2%. Como puede deducirse de las señales de la figura, es necesario realizar un bloqueo con BSA e incubar después en una mezcla de AP-cortisol y BSA para disminuir las señales inespecíficas hasta un valor inferior al 10% de la señal máxima.

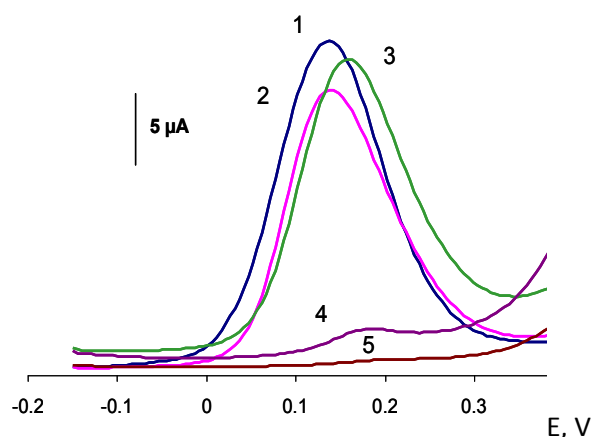


Figura 96.- Voltamperogramas en DPV de: (1) AP-cortisol 1 $\mu\text{g/mL}$; (2) AP-cortisol 1 $\mu\text{g/mL}$ 1 h incub. en BSA 2% (3) AP-cortisol 1 $\mu\text{g/mL}$ 2 h incub. en BSA 2%; (4) AP-cortisol 1 $\mu\text{g/mL}$ + BSA 2% ; (5) AP-cortisol 1 $\mu\text{g/mL}$ + BSA 2% incub. 1 h en BSA 2%.

Por otro lado, en la Figura 97 se muestran las señales en DPV del inmunosensor completo en ausencia (respuesta específica) y en presencia de 250 ng/mL de cortisol (competición), así como la debida a las adsorciones inespecíficas de AP-cortisol sobre la superficie del electrodo. Como puede observarse, hay una gran diferencia entre las señales específicas e inespecíficas, lo que permite la determinación sensible de cortisol trabajando en las condiciones experimentales seleccionadas.

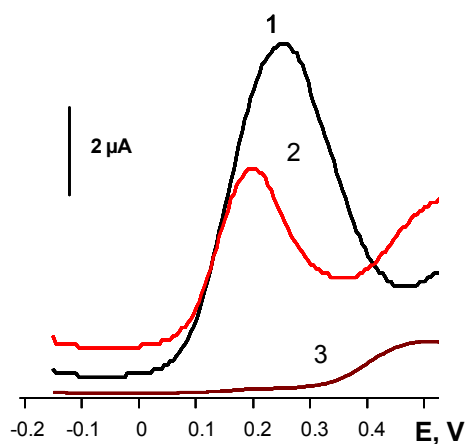


Figura 97.- Voltamperogramas en DPV del inmunosensor AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE; cortisol: (1) 0 ng/mL; (2) 250 ng/mL; (3) señal inespecífica.

Influencia de la concentración de Biotin-ACTH

Para optimizar la concentración de adrenocorticotropina biotinilada se prepararon varios inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 incubando en disoluciones de Biotin-ACTH de diferentes concentraciones en el intervalo de 0 a 2 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 98 se han representado las corrientes de pico en diferencial de impulsos medidas en ausencia de ACTH, observándose un rápido aumento de la respuesta entre 0 y 0.75 $\mu\text{g/mL}$ para pasar a estabilizarse a mayores concentraciones de Biotin-ACTH. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó 1 $\mu\text{g/mL}$ para el trabajo posterior. Por otra parte, un tiempo de 45 min a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$ resultó ser el valor óptimo para la incubación del inmunosensor.

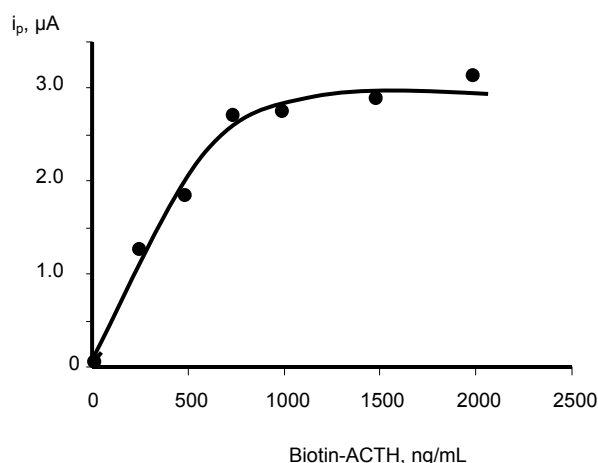


Figura 98.- Optimización de la cantidad de Biotin-ACTH para la preparación del inmunosensor dual para la determinación de ACTH y cortisol.

Influencia de la concentración y el tiempo de incubación de AP-cortisol

Se optimizó la cantidad de cortisol marcado con fosfatasa alcalina necesaria para saturar los sitios de unión del anticuerpo anti-cortisol. Para ello se prepararon distintos inmunosensores AP-cortisol/ cortisol-anti-cortisol-APBA/ SPCE2, empleando distintas concentraciones de AP-cortisol en el intervalo de 0 a 2 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 99 se ha representado la variación de la corriente de pico obtenida, observándose un aumento brusco de la señal con la concentración para bajas concentraciones de AP-cortisol y la estabilización de la misma a partir de 1 $\mu\text{g/mL}$, lo que indica que tiene lugar la saturación de los sitios de unión del anticuerpo. Teniendo en cuenta estos

resultados, la concentración de hormona marcada elegida fue de 1.0 $\mu\text{g/mL}$. En estas condiciones, se eligió un tiempo de incubación de 45 minutos a 4 °C como más apropiado para lograr una adecuada competición entre cortisol y AP-cortisol por las posiciones de unión del anticuerpo.

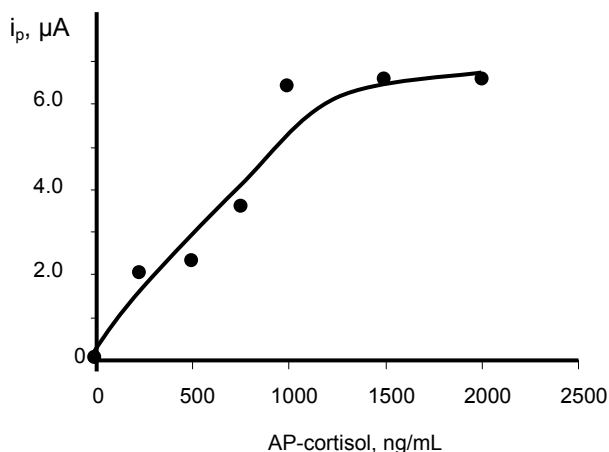


Figura 99.- Optimización de la cantidad de hormona marcada en la preparación del inmunosensor dual para la determinación de ACTH y cortisol.

Influencia de la concentración y tiempo de incubación de AP-Strept

Para seleccionar la concentración más adecuada de este conjugado, se prepararon inmunosensores incubando en disoluciones de AP-Strept de concentraciones comprendidas entre 0 y 3 $\mu\text{g/mL}$, representándose en la Figura 100 los resultados obtenidos. Como puede observarse, la corriente de pico aumenta con la concentración de estreptavidina marcada hasta un valor de 2 $\mu\text{g/mL}$, estabilizándose a partir de dicho valor. Por tanto, esta concentración, que probablemente corresponde a la mínima necesaria para la saturación de las moléculas de Biotin-ACTH del electrodo, fue seleccionada para estudios posteriores. Todos los ensayos se realizaron empleando un tiempo de incubación de 60 minutos y una temperatura de 4 °C.

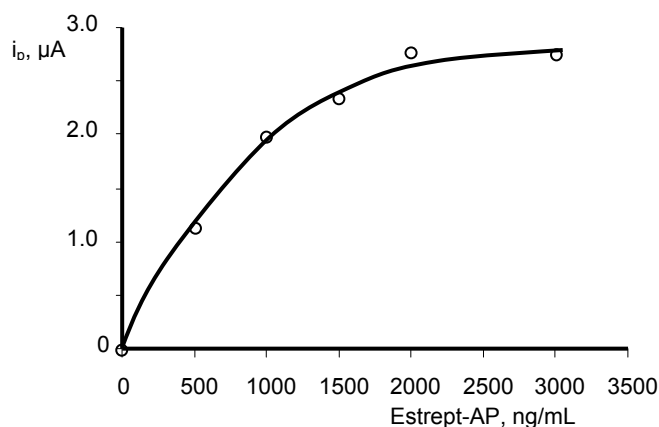


Figura 100.- Optimización de la cantidad de AP-Strept empleada en el inmunosensor para la determinación de ACTH.

Influencia de la concentración de 1-naftilfosfato y del tiempo de hidrólisis

Como ya se ha mencionado, en ambos inmunosensores se empleó 1-naftilfosfato (1-NPP) como sustrato de la enzima fosfatasa alcalina. Para optimizar su concentración, se evaluó la respuesta de los dos inmunosensores, AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2, empleando diferentes concentraciones de 1-NPP en el intervalo comprendido entre 5×10^{-6} y 0.1 M. En la Figura 101 se ha representado la variación de la respuesta de corriente en función de dicha concentración, que se adicionaba sobre las dos superficies inmunosensoras conteniendo cada una de ellas, 45 μL de regulador Trizma. La respuesta más intensa se obtuvo, en ambos casos, adicionando 5 μL de 1-NPP 50 mM. Esta concentración es suficientemente alta como para asegurar que la velocidad de la reacción enzimática depende únicamente de la concentración de enzima sobre el electrodo. Al igual que en casos anteriores, para concentraciones superiores de sustrato la señal comienza a disminuir, lo que puede atribuirse, bien al ensuciamiento de la superficie electródica, dada la elevada cantidad de 1-naftol generada en la reacción enzimática, o bien a una pérdida de la actividad enzimática producida por la saturación de la enzima.

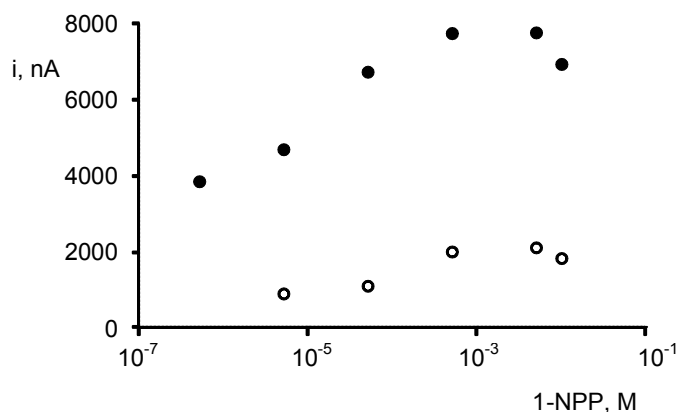


Figura 101.- Influencia de la concentración de 1-NPP sobre las respuestas de los inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 (○) y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2 (●).

Para optimizar el tiempo necesario para que tenga lugar la reacción de hidrólisis en presencia de fosfatasa alcalina, se estudiaron periodos comprendidos entre 0 y 10 minutos, con los resultados que se muestran en la Figura 102, observándose cómo la señal voltamperométrica aumenta a medida que lo hace el tiempo hasta llegar a 8 minutos, permaneciendo prácticamente constante para tiempos superiores.

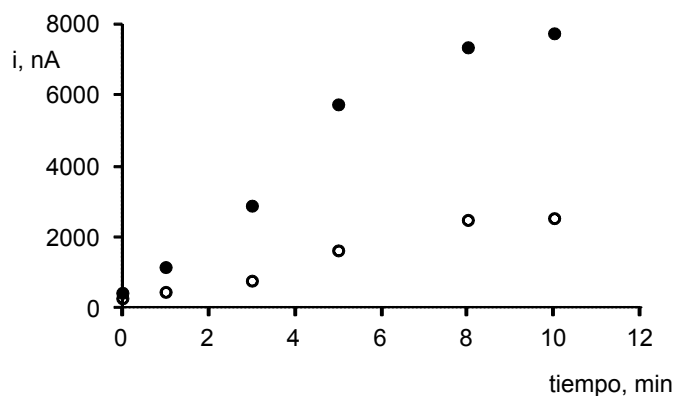


Figura 102.- Influencia del tiempo de hidrólisis en la respuesta en DPV obtenida por incubación en 1-NPP de los inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 (○) y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2 (●).

A la vista de estos resultados, y con el fin de lograr una buena sensibilidad y un corto tiempo de análisis, se escogieron ocho minutos como tiempo óptimo y una concentración de 1-naftilfosfato de 0.005 M.

En la Tabla 15 se recogen las variables estudiadas, los intervalos valorados y el valor elegido en cada caso para estudios posteriores.

Tabla 15.- Optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación de los inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH/ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 y AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2, para la determinación simultánea de ACTH y cortisol.

Variable experimental	Rango estudiado	Valor seleccionado
anti-ACTH, µg/mL	0-80	30
anti-cortisol, µg/mL		50
BSA (ACTH)		2%, 60 min
BSA (cortisol)		2%, 60 min
Biotin-ACTH, ng/mL	0 – 2000	1000
AP-cortisol, ng/mL (+BSA, 2%)	0 - 2000	1000
[AP-Strept], µg/mL	0 - 3000	2000
1-naftilfosfato, M	$5 \cdot 10^{-6}$ - 0.1	0.005
tiempo de hidrólisis, min	0 - 10	8

5.3.2.4. Calibrados y características analíticas

La figura 103 muestra los calibrados para ACTH y cortisol obtenidos de forma simultánea mediante voltamperometría diferencial de impulsos empleando las condiciones experimentales optimizadas anteriormente. Como corresponde al carácter competitivo de ambos inmunensayos, se obtuvieron curvas con forma sigmoideal y pendiente negativa, que abarcan concentraciones de ACTH y de cortisol comprendidas en los intervalos 5×10^{-8} - 50 ng/mL, y 5×10^{-4} - 5×10^3 ng/mL, respectivamente.

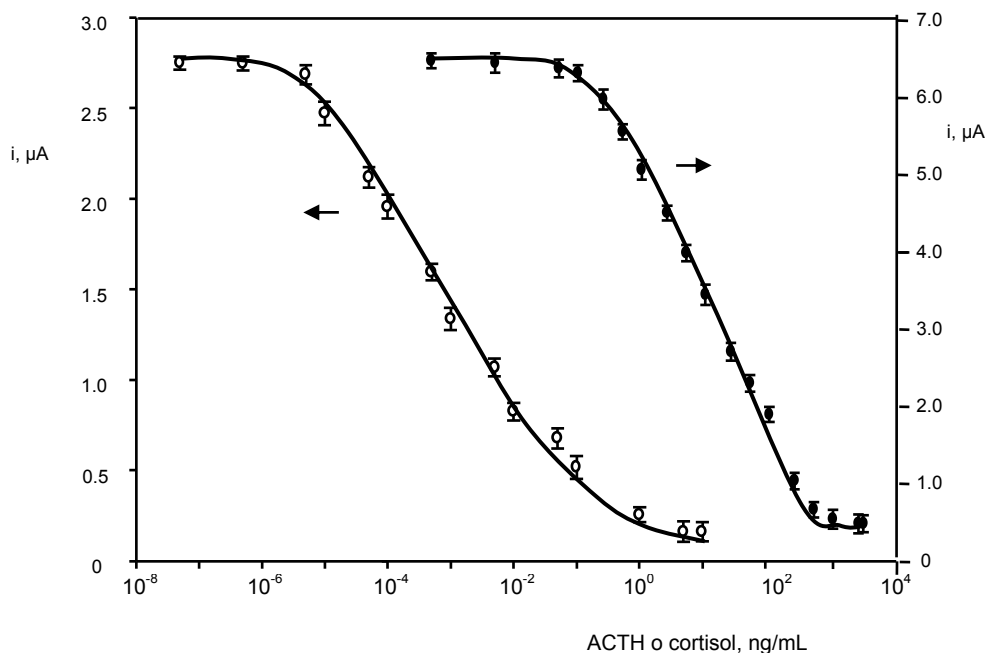


Figura 103.- Calibrado para la ACTH (○) y el cortisol (●) obtenido con AP-Strept/Biotina-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 y AP-cortisol/anti-cortisol/ APBA/ SPCE2 inmunosensores.

En la Tabla 16 se resumen las características analíticas de los calibrados para la determinación de ACTH y cortisol empleando el inmunosensor dual. Como puede observarse, en ambos casos se obtuvieron intervalos amplios de linealidad. Los límites de detección, de 0.004 pg/mL y 37 pg/mL para ACTH y cortisol respectivamente, son mucho más bajos que los obtenidos para otras configuraciones encontradas en la bibliografía (ver Apdos. 3.2.3. y 3.2.4.). Con fines comparativos, se han incluido en la Tabla las características analíticas del inmunosensor de ACTH y del magnetoinmunosensor de cortisol desarrollados en esta Memoria. Como era de esperar, el intervalo lineal y el límite de detección para el ACTH son similares al obtenido en el inmunosensor de ACTH dado que ambos se basan en la misma configuración. Las diferencias observadas son atribuibles a la diferencia de área de los electrodos serigrafiados de carbono empleados en cada caso. Sin embargo, en el caso del cortisol, el límite de detección obtenido con el magnetoinmunosensor es más de 100 veces inferior, aunque el intervalo lineal es más amplio. Estas diferencias no pueden deberse únicamente a la menor área de electrodo dual, sino a la elevada capacidad que poseen las micropartículas magnéticas para inmovilizar una alta concentración de biomoléculas sobre el electrodo, lo que se traduce en una mayor sensibilidad.

Tabla 16.- Características analíticas del inmunosensor para la detección simultánea de ACTH y cortisol y del inmunosensor de ACTH y magnetoinmunosensor de cortisol.

Analito	Intervalo lineal, ng/mL	r	EC ₅₀ , ng/mL	Pendiente de Hill	LOD, pg/mL
ACTH dual	$5.0 \times 10^{-6} - 0.1$	0.991	0.0007 ± 0.0002	-0.37 ± 0.03	0.004
Cortisol dual	0.1 - 500	0.996	12 ± 2	-0.50 ± 0.03	37
ACTH	$25 \times 10^{-6} - 0.001$	0.995	0.00010 ± 0.00002	-1.16 ± 0.15	0.0182
Cortisol	$5 \times 10^{-3} - 150$	0.998	0.19 ± 0.05	-0.34 ± 0.03	3.5

Estudios de reproducibilidad y estabilidad

Como en casos anteriores, la reproducibilidad de las medidas se evaluó registrando los voltamperogramas en DPV de inmunoensayos repetidos realizados el mismo día y en diferentes días, en presencia de ACTH 1 pg/mL o cortisol 10 ng/mL (valores próximos al EC₅₀ en cada caso) o en ausencia de hormonas. Para ocho ensayos realizados el mismo día en presencia de ACTH y cortisol en las concentraciones anteriormente indicadas se obtuvieron valores de la desviación estándar relativa (RSD) de 7.4% y 5.9%, respectivamente, y para los estudios realizados en días diferentes, los valores de RSD fueron del 8.5% y 8.1%, respectivamente. Para ocho ensayos en ausencia de ACTH y cortisol realizados el mismo día, los valores de RSD obtenidos fueron del 6.3%, en ambos casos; en cambio, cuando los estudios se realizaron en días diferentes la desviación estándar relativa fue de 7.6 y 7.9%, para ACTH y cortisol, respectivamente.

Por otro lado, se estudió la estabilidad de los inmunosensores anti-ACTH-APBA/SPCE1 y anti-cortisol-APBA/SPC2, preparando varias réplicas de cada electrodo modificado con el complejo biológico el mismo día, y realizando en sucesivos días el inmunoensayo, en ausencia de hormona, a partir de uno de los dispositivos almacenados. Cada vez se registraron los voltamperogramas en DPV tras la adición del sustrato y un tiempo de espera de 8 minutos. En la Figura 104 se muestran los resultados obtenidos representados en forma de gráficos de control, para un periodo de tiempo de 21 días, siendo cada punto la media de tres medidas sucesivas obtenidas el mismo día. Como puede observarse, la respuesta de ambos bioelectrodos

permanece dentro de los límites de control situados a ± 3 veces la desviación estándar de las medidas realizadas el primer día de trabajo, durante un periodo de 15 días.

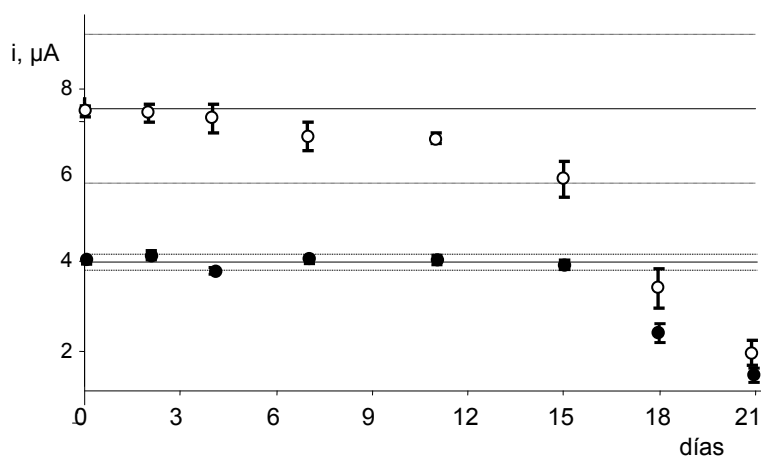


Figura 104.- Gráfico de control para anti-ACTH/APBA/SPCE1 (●) y anti-cortisol/ APBA/ SPCE2 (○).

De forma análoga se estudió también la estabilidad de los inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 y AP-cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2, con los resultados que se muestran en la Figura 105. Como puede observarse, la estabilidad en este caso es menor para ambas configuraciones, obteniéndose tan solo un 30% aproximadamente de la corriente inicial después de 12 días de trabajo.

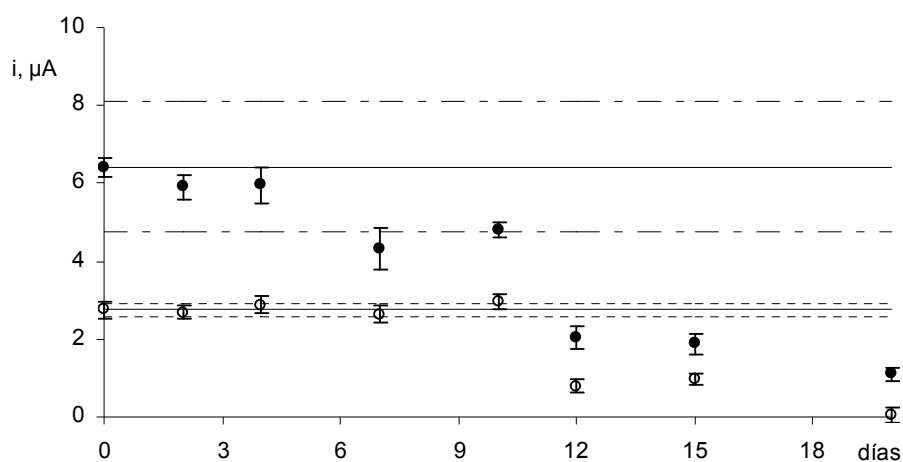


Figura 105.- Gráfico de control para AP-Strept-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE1 (●) y AP-cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2, anti-ACTH/APBA/SPCE1 (○).

5.3.2.5. Estudios de reactividad cruzada

Debido a que ya se han realizado estudios de interferencias para la determinación de cada hormona por separado en capítulos anteriores, aquí se investigó la posible interferencia de cada una de las hormonas en el inmunosensor de la otra, teniendo en cuenta la proximidad entre los dos electrodos de trabajo. En la Figura 106 se comparan los voltamperogramas en diferencial de impulsos correspondientes a dos inmunosensores AP-cortisol-anti-cortisol-APBA/SPCE2 adicionando una mezcla que contiene 1 $\mu\text{g/mL}$ de AP-cortisol más el interferente ACTH en concentración 50 ng/mL (curva 1), y 1 $\mu\text{g/mL}$ de AP-cortisol en ausencia de ACTH (curva 2). De igual modo, se registraron los voltamperogramas correspondientes a dos inmunosensores AP-Strept-Biotin-ACTH-APBA/SPCE1 adicionando 500 ng/mL de cortisol más 1 $\mu\text{g/mL}$ de Biotin-ACTH (curva 3), y 1 $\mu\text{g/mL}$ de Biotin-ACTH en ausencia de cortisol (curva 4). Como puede observarse, no existen diferencias apreciables en las respuestas voltamperométricas obtenidas en ausencia o presencia de la hormona interferente, lo que pone de manifiesto la especificidad de los anticuerpos utilizados.

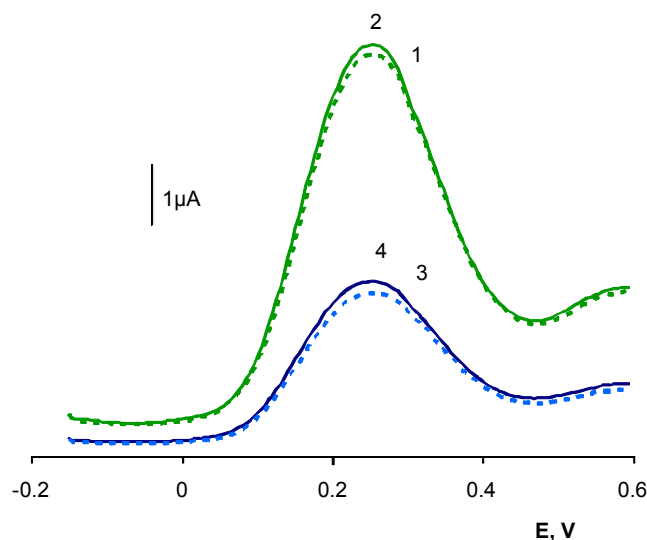


Figura 106.- Voltamperogramas en DP de: AP-cortisol+ACTH/anti-cortisol/APBA/SPCE2 (1 - -); AP-cortisol/anti-cortisol/APBA/SPCE2 (—); AP-Strept/Biotin-ACTH + cortisol/anti-ACTH/APBA/SPCE1 (3 - -); AP-Strept/Biotin-ACTH/anti- ACTH/APBA/SPCE1 (4 —).

5.3.2.6. Aplicación a la determinación de ACTH y cortisol en suero humano

La utilidad del inmunosensor para la determinación simultánea de ACTH y cortisol se evaluó mediante el análisis de muestras certificadas de suero humano que contenían 10 µg/mL de ACTH y 277ng/mL de cortisol. En primer lugar se comprobó la ausencia de efecto matriz, construyendo calibrados de ACTH y cortisol a partir de diluciones del suero reconstituido en disolución reguladora, en el intervalo de concentraciones de 0.01 a 100 pg/mL de ACTH, y de 0.1 a 200 ng/mL de cortisol. Se observó que los calibrados obtenidos a partir del material de referencia coincidían prácticamente con el calibrado de disoluciones estándar. Así, los valores de las pendientes de los tramos lineales fueron $-0.507 \pm 0.006 \mu\text{A}$ ($r = 0.999$) para ACTH y $-1.6 \pm 0.1 \mu\text{A}$ ($r = 0.998$) para cortisol, valores muy similares a los obtenidos a partir de disoluciones patrón de ambas hormonas, $-0.510 \mu\text{A}$ y $1.59 \mu\text{A}$, respectivamente. Estos resultados permiten deducir la ausencia de efecto matriz, que hace posible la determinación de ACTH y de cortisol mediante interpolación de las corrientes de pico obtenidas para las muestras de suero en el calibrado de patrones correspondiente.

Los resultados obtenidos para cuatro concentraciones diluidas a partir de las muestras de suero certificadas de ambas hormonas, se muestran en la Tabla 17. Como puede observarse, las recuperaciones obtenidas varían entre 98.3 ± 0.1 y $102 \pm 3\%$ para ACTH y 99 ± 9 y $104 \pm 8\%$ para cortisol. Estos resultados demostraron la utilidad del inmunosensor desarrollado para la determinación simultánea de ACTH y cortisol en suero humano.

Tabla 17.- Determinación simultánea de ACTH y cortisol en muestras certificadas de suero.

Añadido		Encontrado			
ACTH, pg/mL	Cortisol, ng/mL	ACTH, pg/mL	Recuperación, %	Cortisol, ng/mL	Recuperación, %
0.01	0.1	0.0102 ± 0.0005	99 ± 5	0.099 ± 0.009	99 ± 9
0.1	2.5	0.102 ± 0.003	102 ± 3	2.6 ± 0.2	104 ± 8
10	100	10.0 ± 0.1	100 ± 1	103 ± 5	103 ± 5
100	200	98.3 ± 0.1	98.3 ± 0.1	204 ± 7	102 ± 4

5.3.2.7. Conclusiones

Se ha descrito por primera vez la preparación y aplicación de un inmunosensor electroquímico múltiple para la determinación simultánea de ACTH y cortisol basado en la inmovilización de los anticuerpos específicos sobre la superficie electródica modificada con APBA de un electrodo dual serigrafiado de carbono. El uso de esta configuración y el establecimiento de esquemas de inmunoensayo competitivo con Biotin-ACTH y AP-Strept, o con AP-cortisol empleando 1-naftilfosfato para monitorizar las reacciones de afinidad mediante DPV, proporcionan excelentes características analíticas para la determinación de ambas hormonas en términos de sensibilidad y selectividad, así como una buena reproducibilidad.

Por lo tanto, este inmunosensor multianalito puede ser considerado como una herramienta analítica útil y asequible para la determinación rápida de ACTH y cortisol en muestras de interés clínico, como se ha puesto de manifiesto en la aplicación a muestras de suero humano certificadas.



6. CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de la Memoria se han ido exponiendo conclusiones al trabajo presentado en los distintos capítulos, en las que se han resaltado los hitos alcanzados y se han comparado las configuraciones desarrolladas con las de otros biosensores, en caso de existir, o con otras técnicas utilizadas previamente. De un modo general, puede decirse que a través de las investigaciones realizadas, se han explorado las posibilidades electroanalíticas de materiales de última generación, así como de técnicas de inmovilización novedosas, con el fin de poner a punto dispositivos analíticos y métodos de determinación de hormonas competitivos con los procedimientos existentes. Debe destacarse la preparación de los primeros inmunosensores electroquímicos existentes para prolactina y adrenocorticotropina. Además, como se ha señalado en cada caso, las características analíticas de los métodos puestos a punto en esta Tesis Doctoral, mejoran las de los procedimientos previos, principalmente en términos de sensibilidad, intervalo de linealidad y reproducibilidad. Finalmente, todos los biosensores han demostrado su utilidad práctica por aplicación a muestras biológicas para la determinación de los analitos estudiados a niveles fisiológicos.



7. BIBLIOGRAFÍA

- ♦ [Abad, 2002]: J. bad, M. Velez, C. Santamaría, J. Guisan, P. Matheus, L. Vázquez, I. Gazaryan, L. Gorton, T. Gibson, V. Fernández, J. Am. Chem. Soc., 124 (2002) 12845-12853.
- ♦ [Agüí, 2008]: L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Anal. Chim. Acta, 622 (2008) 11-47.
- ♦ [Aguilera, 2009]: R. Aguilera, T.E. Chapman, H. Pereira, G.C. Oliveira, R.P. Illanes, T. F. Fernandes, D. A. Azevedo, F. A. Neto, J. Steroid Biochem., 115 (2009) 107-114.
- ♦ [Ahuja, 2007]: T. Ahuja, I. A Mir, D.Kumar, Biomaterials, 28 (2007) 791-805.
- ♦ [Anfossi, 2002]: L. Anfossi, C. Tozzi, C. Giovannoli, C. Baggiani and G. Giraudi, Anal. Chim. Acta, 468 (2002) 315-321.
- ♦ [Arlt, 2005]: W. Arlt, P.M. Stewart., Endocrinol. Metab. Clin. North. Am., 34 (2005) 293-313.
- ♦ [Aron, 1994]: D.C. Aron y J.B. Tyrell. Glucocorticoids & Adrenal Androgens. en: Greensoan FS, Baxter JD (eds), Basic & Clinical Endocrinology, 4 ed., Appleton & Lange, USA 1994, 307-346.
- ♦ [Arthur, 2001]: Arthur J. Wayne A., Victor G., David L., Daniel F., John A., Carl C., Robert T., Bert A., Scott L., Clin. Pharmacol. Ther., 69 (2001) 89-95.
- ♦ [Bartling, 2009]: B.Bartling, L. Li, C.C. Liu, Analyst, 134 (2009) 973-979.
- ♦ [Battais, 1977]: E. Battais, B. Terouanne, J.C. Nicolas, B. Descomps, A. Crastes de Paulet, Biochimie, 59 (1977) 909-917.
- ♦ [Beauregard, 2002]: C. Beauregard, G. Dickstein, A. Lacroix, Treat Endocrinol., 1 (2002) 79-94.
- ♦ [Brossaud, 2011]: J. Brossaud, M. Bouton, B. Gatta, A. Tabarin, J.B. Corcuff, Clin. Biochem., 44 (2011) 1160-1162.
- ♦ [Carralero, 2007]: V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Anal. Chim. Acta, 596 (2007) 86-91.
- ♦ [Centi, 2007]: S. Centi, S. Laschi, M. Mascini, Talanta, 73 (2007) 394-399.
- ♦ [Chakraborty, 2007]: S. Chakraborty, C. Retna Raj, Electrochem. Commun., 9 (2007) 1323.
- ♦ [Clark, 1962]: L.C. Clark, C. Lyons, Ann. N.Y. Acad. Sci., 102 (1962) 29.
- ♦ [Cone, 2005]: R.D. Cone, Nature Neurosci, 8 (2005) 571-578.
- ♦ [Conneely, 2007]: G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, G. G. Guilbault, Anal. Chim. Acta, 583 (2007) 153-160.
- ♦ [Cook, 1997]: C. J. Cook, Nat. Biotechnol., 15 (1997) 467-471.
- ♦ [D'Orazio, 2003]: P. D'Orazio,. Clin. Chim. Acta, 334 (2003) 41-59.
- ♦ [Dobson, 1987]: S. Dobson, A. White, M. Hoadley, T. Lovgren, J. Ratcliffe, Clin. Chem. (1987) 1747-1751

- ♦ [Du, 2010]: D. Du, Z.X. Zou, , Y.S. Shin, J. Wang, , H. Wu, M.H. Engelhard, J. Liu, I.A. Aksay, Y.H. Lin, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2989–2995.
- ♦ [Dubrovsky, 2005]: B.O. Dubrovsky, *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, 29 (2005) 169–192.
- ♦ [Eguílaz, 2010]: M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2010) 517–522.
- ♦ [Engelmann, 2004]: M. Engelmann, R. Landgraf, C.T. Wotjak. *Front Neuroendocrinol.*, 25 (2004) 132–149.
- ♦ [Flynn, 1972]: A. Flynn, O.A. Hill Jr., W.J. Pories, W.H. Strain, *Biochem Biophys Res Commun.*, 47(1972) 910–915.
- ♦ [Frasconi, 2009]: M. Frasconi, M. Mazzarino, F. Botrè y F. Mazzei, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 2151–2159.
- ♦ [Gärtner, 2003]: P. Gärtner, C. Novak, C. Einzinger, W. Felzmann, M. Knollmüller, G. Gmeiner, W. Schänzer, *Steroids*, 68 (2003) 85–96.
- ♦ [Ghindilis, 1998]: A. L. Ghindilis, P. Atanasov, M & E. Wilkins, *Biosens. Bioelectron.*, 13 (1998) 113–131.
- ♦ [Giraudi, 1999]: G. Giraudi, L. Anfossi, I. Rosso, C. Baggiani, C. Giovannoli and C. Tozzi, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4697–4700.
- ♦ [Gomori, 1955]: G. Gomori, *Meth. Enzym.*, 1 (1955) 138–146.
- ♦ [Hasinski, 1998]: S. Hasinski. *Postgrad Med*, 104 (1998) 61–64.
- ♦ [Hausling, 1991]: L. Häussling, B. Michel, H. Ringsforf, H. Rohrer, *Angew.Chem.*, 30 (1991) 569–572.
- ♦ [Ho, 2010]: J.A. Ho, W.A. Hsu, W.C. Liao, J.K. Chiu, M.L. Chen, H.C. Chang, C.C. Li, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2010) 1021–1027.
- ♦ [Im, 2010]: J. E. Im, J. A. Han, B. K. Kim, J. H. Han, T. S. Park, S. Hwang, S. I. Cho, W. Y. Lee, Y. R. Kim, *Surf. Coat. Technol.*, 205 (2010) S275–S278
- ♦ [Ishizaki, 2010]: A. Ishizaki, H. Kataoka, *J. Pharm. Biol. Anal.*, 52 (2010) 727–733.
- ♦ [Ito, 2000]: S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 57–63
- ♦ [Jacobson, 2005]: L. Jacobson, *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 34 (2005) 271–292.
- ♦ [Jia, 2002]: M. Jia, Z. He and W. Jin, *J. Chromatogr. A*, 966 (2002) 187–194.
- ♦ [Jung, 2007]: Y. Jung, J. Lee, H. Jung, B.Chung, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 6534–6541.
- ♦ [Kachoosangi, 2009]: R.T. Kachoosangi, M.M. Musameh, I. Abu-Yousef, J.M. Yousef, S.M. Kanan, L. Xiao, S.G Davies, A. Russell, R.G. Compton, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 435–442.
- ♦ [Katz, 2003]: E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis.*, 15 (2003) 913–947.

- ♦ [Kim, 2012]: B.K. Kim, J. Li, K.S. Ahn, T.S. Park, S.I. Cho, Y.R. Kim, W.Y. Lee, J. Electroanal. Chem., 671 (2012) 106-111.
- ♦ [Kulys, 1980]: J. Kulys, V. Razumas, A. Malinauskas, Bioelectrochem. Bioenerg., 7 (1980) 11-24.
- ♦ [Kumar, 2007]: A. Kumar, S. Aravamudhan, M. Gordic, S. Bhansali, S.S., Mohapatra, Biosens. Bioelectron., 22 (2007) 2138-2144.
- ♦ [Liang, 2008]: K-Z. Liang, J-S. Qi, W-J. Mu, Z-G. Chen, J. Biochem. Biophys. Meth., 70 (2008) 1156-1162.
- ♦ [Lin, 2004]: L. Lin, J.C. Achermann. Horm. Res., 62 (2004) 22-29.
- ♦ [Lindsay, 2005]: J.R. Lindsay, L.K. Nieman, Endocrinol. Metab. Clin., 34 (2005) 403-421.
- ♦ [Liu, 2005]: H. Liu, P. He, Z. Li, C. Sun, L. Shi, Y. Liu, G. Zhu y J. Li, Electrochem. Commun., 7 (2005) 1357-1363.
- ♦ [Liu, 2009]: X. Liu, D.K.Y. Wong, Talanta, 77 (2009) 1437.
- ♦ [Liu, 2010]: X. Liu, P. A. Duckworth, D. K. Y. Wong, Biosens. Bioelectron., 25 (2010) 1467-1473.
- ♦ [Liu, 2011]: X. Liu, R. Zhao, W. Mao, H. Feng, X. Liu, D.K.Y. Wong, Analyst, 136 (2011) 5204.
- ♦ [Liu, 2012BB]: X.Q. Liu, X.H. Wang, J.M. Zhang, H.Q. Feng, X.H. Liu, D.K.Y. Wong, Biosens. Bioelectron., 35 (2012) 56-62.
- ♦ [Liu, 2012SA]: S. Liu, Q. Lin, X. Zhang, X. He, X. Xing, W. Lian, J. Li, M. Cui, J. Huang, Sens. Actuators B, 166-167 (2012) 562-568
- ♦ [López-Gil, 2002]: M. A. López-Gil, F.Ortega, Schironia, 1 (2002) 51-59.
- ♦ [Lu, 1996]: B. Lu, M. R Smith, R. O'Kennedy, Analyst, 121 (1996) 29-32.
- ♦ [Lu, 2006]: H. Lu, G. Conneely, M. Pravda, G. G. Guilbault, Steroids, 71 (2006) 760-767.
- ♦ [Manso, 2007]: J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, J. Electroanal. Chem., 603 (2007) 1.
- ♦ [Manso, 2008]: J. Manso, M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Electrochim. Acta, 53 (2008) 4007-4012.
- ♦ [Marquette, 2006]: C. A.Marquette, L. Blum, J. Biosens. Bioelectron., 21 (2006) 1424-1433.
- ♦ [Miller, 2000]: J.N. Miller, J.C. Miller, Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th ed., Prentice Hall, 2000, pp. 116-123.
- ♦ [Mondal, 2007]: M. Mondal, C. Rajkhowa, B.S. Prakash, Anim. Repr. Sci., 99 (2007) 182-195.
- ♦ [Monerris, 2012]: M. J. Monerris, F. J. Arévalo, H. Fernández, M. A. Zon, P. G. Molina, Sens. Actuators B, 166-167 (2012) 586-592.

- ♦ [Musameh, 2002]: M. Musameh, J. Wang, Lin. Y. Merkoçi, *Electrochem. Commun.*, 4 (2002) 743.
- ♦ [Musameh, 2008ACA]: M. Musameh y J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 606 (2008) 45–49.
- ♦ [Musameh, 2008BB]: M. Musameh, R.T. Kachoosangi, L. Xiao, A. Russell, R.G. Compton, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 87-92.
- ♦ [Nara, 2008]: S. Nara y V. Tripathi, *Talanta*, 77 (2008) 210–216.
- ♦ [Newell-Price, 1998]: J. Newell-Price, P. Trainer, M. Besser, A. Grossman., *Endocr Rev*, 19 (1998) 647–672.
- ♦ [Norton, 2001]: J.A. Norton, M. Li, J. Gillary, H.N. Le, *Curr. Prob. Surgery*, 38 (2001) 448–545.
- ♦ [Oliver, 2003]: R.L. Oliver, J.R. Davis, A. White. *Pituitary*, 6 (2003) 119-126.
- ♦ [Opallo, 2011]: M. Opallo, A. Lesniewski, *J. Electroanal. Chem.*, 656 (2011) 2.
- ♦ [Pedano, 2004]: M.L. Pedano, G.A. Rivas, *Electrochem. Commun.*, 6 (2004) 1015.
- ♦ [Pemberton, 2005]: R.M. Pemberton, T.T. Mottram, J.P. Hart, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 63 (2005) 201–212.
- ♦ [Penning, 1984]: T.M. Penning, I. Mukharji, S. Barrows, P. Talalay, *Biochem. J.*, 222 (1984) 601-611.
- ♦ [Penning, 1996]: T.M. Penning, J.E. Pawlowski, B.P. Schlegel, J.M. Jez, H. K. Lin, S.S. Hoog, M.J. Bennett, M. Lewis, *Steroids*, 61 (1996) 508-523.
- ♦ [Petrou, 2002]: P.S. Petrou, S.E. Kakabako, I. Christofidis, P. Argitis, K. Misiakos, *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 261–268.
- ♦ [Pingarrón, 1999]: J.M. Pingarrón, P. Sánchez, “Química Electroanalítica: fundamentos y aplicaciones”. Ed. Síntesis S.A., Madrid (1999).
- ♦ [Pingarrón, 2008]: J.M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño, A. González-Cortés, *Electrochim. Acta*, 53 (2008) 5848-5866.
- ♦ [Pujos, 2005]: E. Pujos, M. M. Flament-Waton, O. Paisse, M. F. Grenier-Loustalot., *Anal. Bioanal. Chem*, 381 (2005) 244-254.
- ♦ [Pumera, 2006]: M. Pumera, A. Merkoci, S. Alegret, *Sens. Actuators. B Chem.*, 113 (2006) 617.
- ♦ [Rezai, 2009]: B. Rezai, T. Khayamian, N. Majidi, H. Rahmani, *Biosens. Bioelectron.*, 25 (2009) 395-399.
- ♦ [Rosalki, 1998]: S.B. Rosalki., *Int. J. Clin. Pract.*, 52 (1998) 189–191.
- ♦ [Ross, 1998]: R.J.M. Ross, P.J. Trainer., *Clin. Endocrinol.*, 49 (1998) 153–155.
- ♦ [Roy, 2007]: K.S. Roy, B.S. Prakash, *Theriogenology*, 67 (2007) 572–579.
- ♦ [Ruth, 2001]: A. Ruth, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 15 (2001) 1-16.
- ♦ [Sánchez, 2008]: S. Sánchez, M. Roldán, S. Pérez, E. Fábregas, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 6508-6514.
- ♦ [Sarkar, 2006]: M. Sarkar, B.S. Prakash, *Theriogenology*, 65 (2006) 499–516.

- ♦ [Saudan, 2004]: C. Saudan, N. Baume, P. Mangin, M. Saugy, J. Chromatogr. B, 810 (2004) 157–164.
- ♦ [Serafín, 2011]: V. Serafín, M. Eguílaz, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, Electroanalysis, 23 (2011) 169 – 176.
- ♦ [Serra, 2002]: B. Serra, “Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos”. Universidad Complutense de Madrid, (2002).
- ♦ [Sinha, 1995]: Y.N. Sinha, Endocr. Rev., 16 (1995) 354–369.
- ♦ [Souter, 2010]: I. Souter, L.M. Baltagi, T.L. Toth, J.C. Petrozza, Fertil. Steril., 94 (2010) 1159–1162.
- ♦ [Stanczyk, 2003]: F.Z. Stanczyk, P. Bretsky, “Biosynthesis, transport and metabolism of steroid hormones”, en B.E. Henderson, B. Ponder, R.K. Ross, “Hormones, genes and cancer”, Oxford University Press, NY, 2003, pp 22-24.
- ♦ [Stefan, 2000]: R.I. Stefan, J.F. Staden, H.Y. Aboul-Enein, Fresenius J. Anal. Chem., 366 (2000) 659–668.
- ♦ [Sun, 2008]: K. Sun, N. Ramgir and S. Bahnsali, Sens. Actuators, 33 (2008) 533–537.
- ♦ [Talbot, 2003]: J.A. Talbot, J.W. Kane, A. White, Ann. Clin. Biochem., 40 (2003) 453–471.
- ♦ [Tan, 2007]: F. Tan, F.Yan, H. Ju, Biosens. Bioelectron., 22 (2007) 2945–2951.
- ♦ [Tao, 2011]: M. Tao, X. Li, Z. Wu, M. Wang, M. Hua, Y. Yang, Clin. Chim. Acta, 412 (2011) 550–555.
- ♦ [Tedeschi, 2003]: L. Tedeschi, C. Domenici, A. Ahluwalia, F. Baldini, A. Mencaglia, Biosens. Bioelectron., 19 (2003) 85–93.
- ♦ [Teodorczyk, 1990]: M. Teodorczyk, W.C. Purdyt, Talanta, 37 (1990) 795-800.
- ♦ [Teymourian, 2012]: H. Teymourian, A. Salimi, R. Hallaj, Talanta, 90 (2012) 91.
- ♦ [Thevis, 2006]: M. Thevis, M. Bredehöft, H. Geyer, M. Kamber, P. Delahaut, W. Schänzer, Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 (2006) 3551–3556.
- ♦ [Tijssen, 1985]: P. Tijseen, “Practice and theory of enzyme immunoassays” en: R.H. Burdon, P.H. van Knippenberg, eds., “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology”, 15 (1985) 414.
- ♦ [Trinh, 2011]: T. Trinh, N.B. Harden, H.M. Coleman, S.J. Khan, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 1668-1676.
- ♦ [Tunckol, 2012]: M. Tunckol, J. Durand, P. Serp. Carbon., 50 (2012) 4303-4334.
- ♦ [Updike, 1967]: S.J. Updike, G.P. Hicks, Nature, 214 (1967) 986.
- ♦ [Van Eenoo, 2011]: P. Van Eenoo, W. Van Gansbeke, N. De Brabanter, K. Deventer, F. T. Delbeke, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 3306–3316.
- ♦ [Velasco-García, 2003]: M.N. Velasco-García, T. Mottram, Biosystems Eng., 84 (2003) 1-12.

- ♦ [Vogeser, 2000]: M. Vogeser, D. Engelhardt, K. Jacob, Clin. Chem., 46 (2000) 1998–2000.
- ♦ [Wang, 2006]: H. S.Wang, T. H.Li, W. L. Jia, H. Y. Xu, Biosens. Bioelectron., 22 (2006) 664-669.
- ♦ [Wang, 2007]: Q. Wang, H. Tang , Q. Xie, L.Tan, Y. Zhang, B. Li, S. Yao, Electrochim. Acta, 52 (2007) 6630.
- ♦ [Wang, 2008]: H. Wang, G. Shen, R. Yu, “Electrochemical Sensors, Biosensor and their Biomedical Applications”, 9 (2008)237-260.
- ♦ [Wei, 2010]: Q. Wei, X. Xin, B. Du, D. Wu, Y. Han, Y. Zhao, Y. Cai, R. Li, M. Yang, H. Li, Biosens. Bioelectron., 26 (2010) 723–729.
- ♦ [Wei, 2011]: Q. Wei, R. Li, B. Du, D. Wu, Y. Han, Y. Cai, Y. Zhao, X. Xin, H. Li, M. Yang, Sens. Actuators B, 153 (2011) 256–260.
- ♦ [Wendszinski, 1997]: F. Wendszinski, B. Gründig, R. Renneberg, F.Spener, Biosens. Bioelectron., 12 (1997) 43-52.
- ♦ [Xu, 1997]: Y. H. Xu y A. A. Suleiman, Anal. Lett., 30 (1997) 2675–2689.
- ♦ [Xu, 2013]: M. Xu, X. Luo, J. J. Davis, Biosens. Bioelectron., 39 (2013) 21–25.
- ♦ [Yalow, 1971]: Yalow, R.S., Berson, S.A., Biophys. Res. Commun., 44 (1971) 439–445.
- ♦ [Yang, 2009]: G. Yang, Y. Chang, H. Yang, L. Tan, Z. Wu, X. Lu, Y. Yang, Anal. Chim. Acta, 644 (2009) 72–77.
- ♦ [Yoo, 2002]: E. M. Yoo, K. R. Chintalacharuvu, M. L. Penichet, S. L. Morrison, J. Immunol. Methods, 261 (2002) 1-20.
- ♦ [Yuanyuan, 2006]: X.Yuanyuan, X. Shanhong, B. Chao, C. Shaofeng, Ser. F- Info. Sci., 49 (2006) 397-408.
- ♦ [Zacco, 2007]: E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M. P. Marco, S. Alegret, M. I. Pividori, Biosens. Bioelectron., 22 (2007) 2184-2191.
- ♦ [Zatta, 1996]: P. F. Zatta, J. Biochem. Biophys. Meth., 32 (1996) 7-13.
- ♦ [Zhang, 2007EA]: Y. Zhang y J.B. Zheng, Electrochim Acta, 52 (2007) 7210-7216.
- ♦ [Zhong, 2010]: Z. Zhong, W.Wu, D.Wang, D.Wang, J. Shan, Y. Qing, Z. Zhang, Biosens. Bioelectron., 25 (2010) 2379–2383.



8. PUBLICACIONES

**ENZYME BIOSENSOR FOR ANDROSTERONE
BASED ON 3 α -HYDROXYSTEROID
DEHYDROGENASE IMMOBILIZED ONTO A
CARBON NANOTUBES / IONIC LIQUID / NAD⁺
COMPOSITE ELECTRODE**





Enzyme biosensor for androsterone based on 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase immobilized onto a carbon nanotubes/ionic liquid/NAD⁺ composite electrode

R.A. Mundaca, M. Moreno-Guzmán, M. Eguílaz, P. Yáñez-Sedeño*, J.M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2012

Received in revised form

28 June 2012

Accepted 5 July 2012

Available online 16 July 2012

Keywords:

Androsterone

Carbon nanotubes

Ionic liquid

NADH

3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase

Electrochemical biosensor

Human serum

ABSTRACT

A 3 α -hydroxysteroid biosensor for androsterone determination has been prepared by immobilizing the enzyme 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) in a composite electrode platform constituted of a mixture of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), octylpyridinium hexafluorophosphate (OPPF₆) ionic liquid and NAD⁺ cofactor. This configuration allowed the fast, sensitive and stable electrochemical detection of the NADH generated in the enzyme reaction. All the experimental variables involved in the preparation and performance of the enzyme biosensor were optimized. Amperometry in stirred solutions at +400 mV provided a linear calibration plot for androsterone in the 0.5–10 μ M concentration range with a slope value more than 200-times higher than that previously reported. The detection limit achieved was 0.15 μ M and a low value of the apparent Michaelis–Menten constant (K_{app}^M), 36.0 μ M, similar to that reported for the enzyme in solution, was calculated. The 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ biosensor provided good results in the determination of androsterone in spiked human serum samples.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Androsterone, 3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one, is an intermediate product in the synthesis of androgens in humans. It is a metabolite of testosterone as the product of a reaction catalyzed by the enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 17 β -HSD, but it can also be formed from other adrenal androgens such as dehydroepiandrosterone (DHEA) [1]. High levels of androsterone glucuronide are found in the human prostate, breast cyst fluid and ovary follicular fluid. Androsterone is active in the central nervous system and interacts with the gamma-aminobutyric acid (GABA), being considered a neuroactive steroid [2]. It also has a weak activity in regulating male sexual characteristics, and so, it is used in veterinary medicine to counter the effects of castration as well as in bodybuilding activities to increase muscle mass. In this sense, it is considered as an anabolic androgenic steroid, a kind of doping substances whose use was first forbidden by the International Olympic Committee (IOC) at the Olympic Games, held in Montreal, Canada in 1976. The detection of androgenic, anabolic steroids, either from endogenous or synthetic origin, is one of the major tasks in doping analysis. Much work has been done in the last decades to develop analytical methodologies for the detection

of doping substances in biological samples [3]. Recent examples involve the use of gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) for the analysis of mixtures of androsterone and other androgenic and estrogenic hormones [4,5]. Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) was also applied for steroid confirmation analysis in real time during competition [6]. Moreover, the determination of anabolic steroids has also been performed by LC–MS [7,8].

Hydroxysteroid dehydrogenases are a family of nicotinamide nucleotide-dependent oxidoreductases that catalyze interconversions of hydroxy and carbonyl groups of steroids in a positional and sterically specific manner [9]. One of these enzymes, 3 α -HSD, catalyzes specifically the oxidation of the hydroxyl group in position 3 of the molecule. The development of enzyme biosensors based on 3 α -HSD constitutes an interesting analytical strategy for the selective detection of 3 α -hydroxysteroids in complex samples. However, this alternative has been scarcely exploited, and a very few 3 α -HSD biosensors have been described in the literature. Regarding electrochemical biosensors, only two configurations have been found. In the 1990s, an enzyme electrode based on the immobilization of 3 α -HSD on the surface of glassy-carbon and low-temperature isotropic-carbon electrodes by intermolecular cross-linking with bovine serum albumin and glutaraldehyde was described [10]. The linear calibration range extended between 5 and 96 μ M androsterone using a detection potential of +0.6 V. More recently, a configuration making use of

* Corresponding author. Fax: +34 913944329.

E-mail address: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).

a screen printed Ir/C electrode modified with 3α -HSD was applied to the determination of bile acids, a group of acids produced by the degradation of cholesterol in the liver [11].

The extremely attractive properties of CNTs for the electrochemical detection of H_2O_2 and NADH have led to the development of a great number of enzyme biosensors exhibiting rapid electron transfer at the electrode substrate [12]. Among them, carbon nanotubes paste electrodes (CNTPEs), prepared by mixing CNTs with a binder material, show several practical advantages. First, the resulting electrodes retain the properties of conventional carbon paste electrode (CPE) such as the feasibility to incorporate different substances into the paste matrix, the low background currents achieved, the easy renewal and the composite nature [13,14]. Furthermore, these electrodes combine the ability of carbon nanotubes to promote electron-transfer reactions with the attractive advantages of composite materials. Enzymes or other substances can be physically incorporated into the mixture without the need of covalent bonds, and so, the hybrid composite maintains the properties of CNTs unchanged. On the other hand, the use of room temperature ionic liquids (RTILs) as the binder material for the preparation of CNTPEs improves still more the commented advantages [15]. RTILs are ionic media resulting from the combination of organic cations and various anions, which have wide use as nonaqueous, polar, environmentally friendly solvents. Regarding electrochemistry, RTILs are particularly interesting since they display a wide electrochemical potential window and high ionic conductivity. Moreover, composite materials constituted of MWCNTs and the ionic liquid octylpyridinium hexafluorophosphate (OPPF₆) have shown lower background currents compared to graphite and mineral oil CPEs [16]. Furthermore, these electrodes exhibit good activity toward NADH oxidation as well as a marked electrode stability and antifouling features. These capacities can be profited for the development of enzyme biosensor.

In this work we describe the preparation of MWCNTs/OPPF₆ composite electrodes as platforms for immobilization of the 3α -HSD enzyme in order to construct a 3α -hydrosteroid biosensor for androsterone determination. Fig. 1 shows a scheme of the composition and functioning of the biosensor. As a novelty with respect to other dehydrogenase based configurations, the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) was incorporated into the composite matrix. This integration constitutes an efficient strategy for the improved actuation of the co-factor in the

hydrogenase reaction, making possible the fast, sensitive and stable detection of the formed NADH. Very few configurations based on the incorporation of NAD^+ to the electrode matrix have been described in the literature. A lactate biosensor involving the immobilization of both lactate dehydrogenase and NAD^+ on a conducting polymer–MWCNTs composite film electrode was described [17]. Carbon paste electrodes modified with glycerol oxidase and NAD^+ and coated with a poly(*o*-phenylenediamine) film were used for the determination of glycerol in a plant-extract syrup [18]. Glucose dehydrogenase (GDH) biosensors were prepared by covalent attachment of N^1 -carboxymethyl NAD^+ species to polyamino-saccharide chains of chitosan (Chit) and cross-linking with glutaraldehyde (GDI). The Chit– NAD^+ –GDH–GDI–Chit mixture was adsorbed onto the carbon nanotubes and deposited onto glassy carbon electrodes [19]. More recently, a simpler and faster procedure was described for the preparation of a glucose dehydrogenase biosensor based on modification of glassy carbon electrodes with MWCNTs/ NAD^+ composite, where the strong π – π stacking interaction between the adenine moiety in the cofactor and carbon nanotubes provides a high stability [20].

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

3α -Hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD), from *Pseudomonas testosteroni* H1506 (Sigma) was used. Enzyme solutions were prepared by dissolving the product (50 units of enzyme) in 500 μL of 0.1 M phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS). A stock 1 mM androsterone (3α -hydroxy- 5α -androstan-17-one) (Fluka) solution was prepared by dissolving 7.5 mg of the product in 25 mL of a 1:1 acetonitrile–0.1 M PBS solution. More diluted androsterone solutions were prepared from this one by diluting it with 0.1 M PBS. *n*-Octylpyridinium hexafluorophosphate (OPPF₆) (Io-Li-Tec), oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) (Gerbü) and nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form) (NADH) (Sigma) were also used. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs, $\varnothing 30 \pm 15$ nm) with 95% purity were supplied from NanoLab (Brighton, MA). 0.1 M TRIS buffer solution of pH 8.5 was prepared from Tris HCl (Scharlau). Stock 10^{-3} M cortisol (hydrocortisone), 19-nortestosterone (nandrolone), β -estradiol and testosterone solutions were prepared in 1:1 acetonitrile–PBS. More

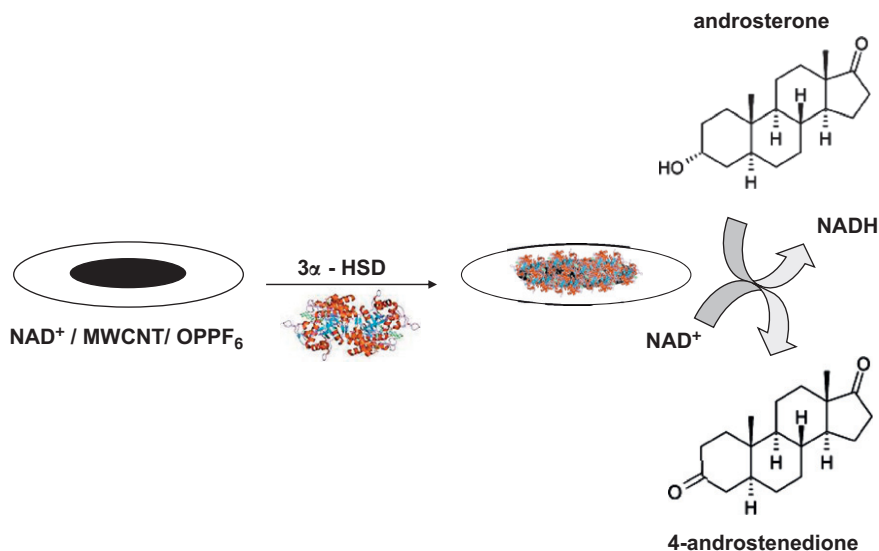


Fig. 1. Scheme displaying the preparation and functioning of the biosensor.

diluted solutions of these compounds were prepared by diluting it with 0.1 M PBS and used for the interference study. Other solvents and chemicals used were of analytical reagent grade and water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system.

2.2. Samples

Analyzed samples were lyophilized human serum from Sigma spiked with androsterone at the 1.25 μM (0.36 $\mu\text{g/mL}$) concentration level. Spiked samples were prepared by adding 50 μL of standard 50 μM androsterone solution to 2.0 mL of serum and they were stored at -40°C until analyzed. Control serum samples (non-spiked) were prepared in 0.1 M PBS pH 7.4.

2.3. Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were carried out using an amperometric detector from InBea Biosensores SL, Madrid, Spain. Cyclic voltammograms were obtained using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.). A three electrodes cell (BAS VC-2 10 mL glass electrochemical cell) equipped with a platinum wire counter electrode (BAS MW-1032), a CHI 111 Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode, and the MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ electrode, or the 3 α -HSD-enzyme biosensor as the working electrodes, were used. All experiments were performed at room temperature.

2.4. Procedures

2.4.1. Preparation of 3 α -HSD/ MWCNTs/ OPPF₆/ NAD⁺ biosensors

Composite MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ electrodes were fabricated from 30 mg MWCNTs, 70 mg OPPF₆ and 20 mg NAD⁺, which were thoroughly mixed until complete homogenization. Portions of the resulting mixture were packed into Teflon holders (3 mm inner diameter) and pressed tightly. The electrical contact was made through a stainless steel screw. Subsequently, a 10 μL aliquot of 3 α -HSD enzyme solution was deposited onto the electrode surface, and allowed to dry overnight at room temperature in darkness.

2.4.2. Determination of androsterone in serum samples

2.0 mL of the sample prepared and stored as described in Section 2.2 was diluted to 5.0 mL with 0.1 M TRIS buffer solution of pH 8.5. Androsterone was determined by amperometry under continuous stirring at a detection potential of +400 mV, which allowed monitoring the oxidation of the generated NADH, and using the standard additions method implying successive additions of 100 μL from 2.5×10^{-5} M androsterone solution.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ biosensor

Firstly, binary MWCNTs/OPPF₆ composites prepared with different carbon nanotubes-ionic liquid percentages were investigated in order to select the optimum ratio for further work. Cyclic voltammetry from 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} in 0.1 M KCl solutions was used for such purpose (Fig. 2). As it can be observed, voltammograms exhibited larger currents as the MWCNTs/OPPF₆ ratio increased, as a consequence of the enhanced active surface area and the double-layer capacitance [16]. However, a large increase in the background current together with a higher instability of the composites were observed when the ionic liquid percentage was lower than 70%. Therefore, a 30:70 MWCNTs/OPPF₆ composition was selected to

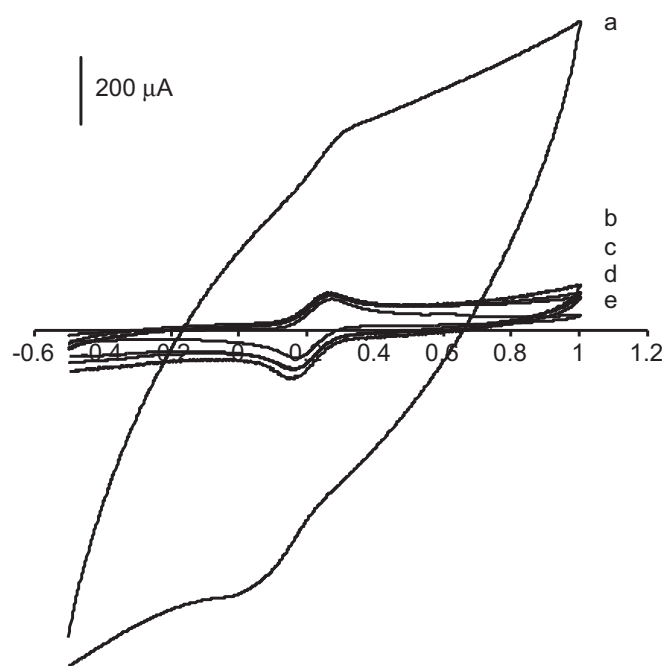


Fig. 2. Cyclic voltammograms of 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} in 0.1 M KCl recorded at (a) 36/64, (b) 35/65, (c) 30/70, (d) 20/80, and (e) 10/90 MWCNTs/OPPF₆ composite electrodes; $v = 100$ mV/s.

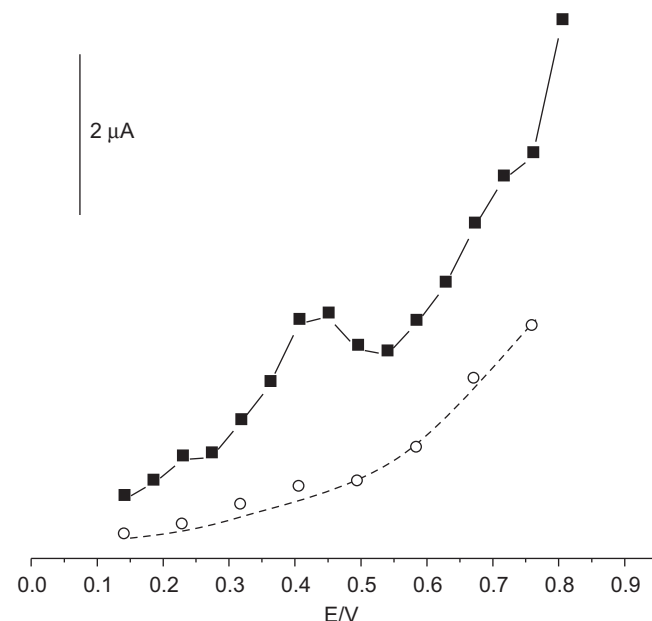


Fig. 3. Effect of the applied potential on the steady-state current measured at a 30/70 MWCNTs/OPPF₆ composite electrode for 5 mM NADH in 0.1 M PBS of pH 7.4. Dotted line, supporting electrolyte.

prepare the electrodic matrices, which exhibited suitable mechanic and conducting properties.

The MWCNTs/OPPF₆ electrode was further used to test the electrochemical behavior of NADH. The results obtained on the influence of the applied potential on the steady-state current measured for a 5 mM NADH solution is displayed in Fig. 3. As it can be observed, significant anodic currents were recorded at the modified electrode for potential values higher than +300 mV. As a compromise between sensitivity and selectivity, a detection potential of +400 mV was selected for further work. At this potential value, a calibration plot was obtained for NADH in the

$2.0\text{--}12.0 \times 10^{-5}$ M concentration range in 0.1 M PBS of pH 7.4 with a slope value of $32.6 \mu\text{A}/\text{mM}$. This value ranks among the highest reported for other composite electrodes using MWCNTs [21,22].

The NAD^+ loading incorporated into the composite electrodes was optimized by testing the amperometric responses of 2.0, 4.0 and 6.0×10^{-6} M androsterone solutions at various $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ biosensors prepared by depositing $10 \mu\text{L}$ of the $3\alpha\text{-HSD}$ enzyme solution onto the electrode surface. The electrodes were prepared with different amounts of NAD^+ in the 0–40% weight range (mg NAD^+ per 100 mg paste). The results obtained (Fig. 4) show as the slope value of the calibration plots constructed for androsterone increased with the NAD^+ loading up to 20% NAD^+ . Higher NAD^+ percentages produced a decrease in the measured currents that can be attributed to the inhibitory effect produced by high cofactor concentrations [23]. The influence of pH on the amperometric response for androsterone was also tested over the 6.0–10.0 range using different 0.1 M phosphate buffer solutions. The slope value of the responses measured for the three androsterone concentrations at the $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ showed a sharp increase between pH 7.0 and 8.5 and a remarkable decrease for higher values (results not shown). This behavior appreciably agrees with previous studies [10]. In order to get the highest sensitivity, pH 8.5 was selected for further work. Moreover, 0.1 M TRIS buffer solution was chosen to regulate that pH value. Under these conditions, the possible leakage of NAD^+ from the modified electrode surface to the electrolyte solution was evaluated. A calibration plot for NAD^+ was constructed by measuring absorbance at 261 nm in the TRIS buffer of pH 8.5 solution. After continuous recording of five cyclic voltammograms with a single MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ modified electrode, interpolation of the absorbance measured in the electrolyte solution into the calibration plot showed that approximately 4% of the NAD^+ confined in the carbon nanotubes paste was leaked from the electrode. Therefore not a very significant leakage of this molecule from the electrode surface was produced under the selected experimental conditions.

The enzyme loading onto the electrode surface was also optimized. The slope values of the calibration graphs obtained for androsterone in the $0\text{--}8.0 \times 10^{-6}$ M concentration range were measured with different biosensors constructed with $3\alpha\text{-HSD}$ loadings between 0.3 and 1.0 enzyme units. The results (not shown) showed that the highest slope value was achieved when 1.0 unit of $3\alpha\text{-hydroxysteroid dehydrogenase}$ was deposited onto the MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ electrode surface. The use of higher enzyme loadings or the incorporation of enzyme into the electrode composite matrix were not considered in order to avoid the increasing biosensor cost.

It is important to remark that cyclic voltammograms from androsterone recorded with a MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ modified electrode did not show any observable voltammetric response. Moreover, amperometric measurements for androsterone carried out with MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ and $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ electrodes revealed that only suitable amperometric responses were obtained with the enzyme electrode.

3.2. Calibration graph and analytical characteristics

Under the optimized working conditions described above, a calibration plot for androsterone was constructed with the $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ biosensor exhibiting a linear range ($r=0.998$) in the $0.5\text{--}10 \mu\text{M}$ concentration range with a slope of $70.3 \mu\text{A}/\text{mM}$. This value is more than two hundred times higher than that obtained with a glassy carbon electrode modified with $3\alpha\text{-HSD}$ and glutaraldehyde at a detection potential of +600 mV [10], in spite of the lower operating potential value used with the $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ biosensor. The detection limit (LOD), $0.15 \mu\text{M}$, was calculated according to the $3sb/m$ criterion, where m is the slope of the linear portion in the calibration graph, and sb was estimated as the standard deviation ($n=10$) of the amperometric signals measured for different androsterone solutions at the lowest concentration level of the calibration graph ($0.5 \mu\text{M}$). Successive amperometric measurements of five independent $6.0 \mu\text{M}$ androsterone solutions carried out with the same biosensor provided a relative standard deviation (RSD) value of 1.8%. Furthermore, the reproducibility of the responses obtained with five different $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ enzyme sensors was also evaluated, yielding a RSD value of 3.5%. These results show fairly well the good repeatability and reproducibility achieved with the developed biosensor.

The enzyme reaction at the $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ composite biosensor fitted well into a Michaelis–Menten kinetics, as it was demonstrated by calculation of the “ x ” parameter (0.99 ± 0.08) from the corresponding Hill’s plot ($[\log(i_{\text{max}}/i) - 1]$ vs. the log of androsterone concentration). Therefore, the apparent Michaelis–Menten constant ($K_{\text{app}}^{\text{M}}$), $36.0 \mu\text{M}$, was calculated from the corresponding Lineweaver–Burk plot. The $K_{\text{app}}^{\text{M}}$ value obtained was much lower than that reported in the literature by immobilization of $3\alpha\text{-HSD}$ onto a glassy carbon electrode, $189 \mu\text{M}$ [10], and is similar to that obtained for the enzyme in a solution of pH 9 using UV–visible spectrophotometry, $30 \pm 3 \mu\text{M}$ [9]. The low $K_{\text{app}}^{\text{M}}$ value obtained reflects a high affinity for the substrate when the enzyme is immobilized in the carbon nanotubes/liquid ionic microenvironment, conversely to

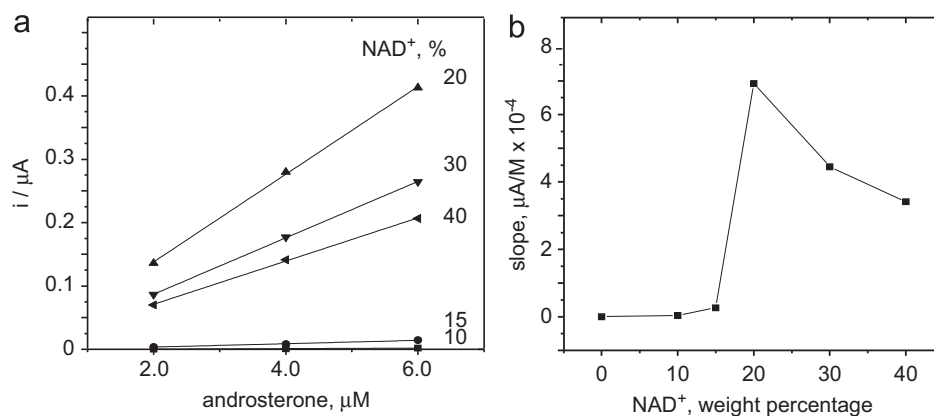


Fig. 4. Influence of the NAD^+ loading in the $3\alpha\text{-HSD}/\text{MWCNTs}/\text{OPPF}_6/\text{NAD}^+$ biosensor on the amperometric responses measured for $2.0\text{--}6.0 \mu\text{M}$ androsterone solutions in 0.1 M pH 8.5 Tris buffer. $E_{\text{app}}=0.4$ V.

that occurred upon immobilization on a carbon disk electrode where enzyme deactivation proceeds rapidly.

The lifetime of a single 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ biosensor was checked by performing daily three calibration plots for androsterone in the 2.0–6.0 concentration range. The mean value of the slopes of these calibrations did not show significant differences (within $\pm 3 \times$ standard deviation of the mean value measured the first day) for at least 6 days, without applying any regeneration procedure to the bioelectrode surface. Therefore, no significant loss the 3 α -HSD enzyme bioactivity or re-dissolution into the electrolyte solution was observed for the above mentioned period of time.

3.3. Interferences study

Various steroid hormones structurally related with androsterone: testosterone, β -estradiol, 19-nortestosterone (nandrolone) and cortisol (Fig. 5), as well as uric and ascorbic acids, were tested as potential interfering compounds. Amperometric currents were measured in 0.1 M Tris buffer pH 8.5 with 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ biosensors for different interfering/androsterone concentration ratios. Among the hormones tested, only β -estradiol produced a significant interference under the experimental conditions used, giving a relative error higher than 5% from an interferent/androsterone ratio of 0.05. This result agreed with the reported slight 17- β -estradiol-dehydrogenase activity from pure 3 α -HSD [24]. However, this concentration is various orders of magnitude higher than the physiological level of β -estradiol in serum samples. Furthermore, cortisol and 19-nortestosterone, at concentrations ten times higher than the respective physiological levels, and testosterone, at a concentration 1000 times higher than its physiological level did not produce any noticeable interfere on the biosensor response to androsterone.

On the other hand, uric and ascorbic acids were electrochemically oxidized at the potential value used for androsterone detection, and, therefore, interference from both compounds was observed from 1.0×10^{-5} to 1.0×10^{-6} M, with relative errors of 3.8% and 3.7%, respectively. The extent of these interferences could be largely minimized by coating the electrode surface with a Nafion film, though at the expense of a noticeable decrease of the calibration slope value. Nevertheless, as it will be

demonstrated below, the determination of androsterone in human sera with the 3 α -HSD/MWCNTs/OPPF₆/NAD⁺ biosensor implied a procedure that allowed a negligible interference to be observed from these endogenous compounds.

3.4. Determination of androsterone in serum samples

The usefulness of the developed enzyme biosensor was evaluated by means of the analysis of human serum samples spiked with androsterone at a 1.25 μ M (0.36 μ g/mL) concentration level. As it is described in Section 2.4.2, 2.0 mL of reconstituted serum was diluted to 5 mL with 0.1 M Tris buffer solution of pH 8.5, and the determination of androsterone was carried out by applying the standard additions method involving 100 μ L additions from a 2.5×10^{-5} M androsterone standard solution. Serum samples with no androsterone did not provide significant amperometric current values at +400 mV, thus demonstrating the absence of interference from endogenous compounds. Mean recoveries obtained ($n=5$) ranged between 97.2% and 103% with a relative standard deviation of 2.7%, which demonstrated fairly well the usefulness of the biosensor for the rapid analysis of androsterone in human serum samples. These results demonstrated also the absence of significant interference from other compounds present in the human serum samples, thus confirming the validity of the methodological approach.

4. Conclusions

A novel enzyme electrode platform, involving a mixture of MWCNTs, an ionic liquid, the incorporation of NAD⁺ cofactor into the electrode matrix and immobilization of 3 α -HSD, has been developed for the determination of the hormone androsterone. The analytical characteristics of the constructed biosensor fulfill the requirements for the analysis of the hormone in human serum samples. Moreover, the versatility of the approach allows direct extrapolation of the strategy to prepare dehydrogenase-based enzyme biosensors in a straightforward manner.

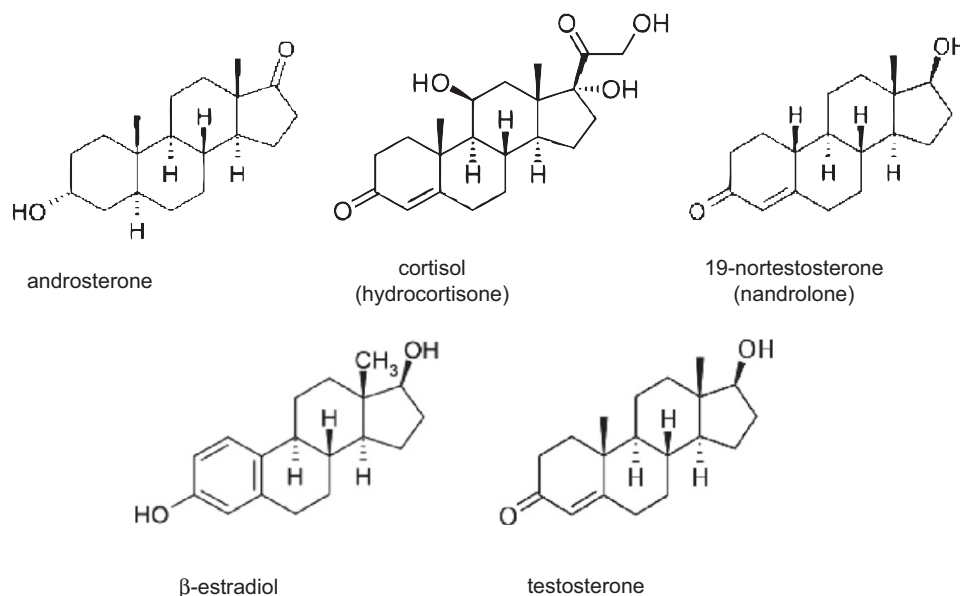


Fig. 5. Structures of androsterone and related compounds.

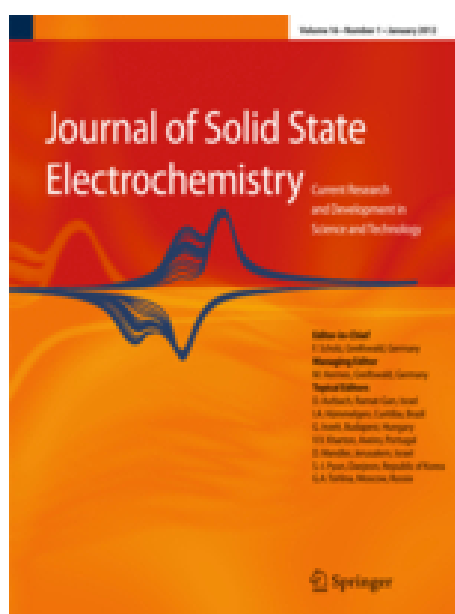
Acknowledgments

Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01 and CTQ2009-12650), and Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642 (AVANSENS), is gratefully acknowledged.

References

- [1] C. Saudan, N. Baume, P. Mangin, M. Saugy, J. Chromatogr. B 810 (2004) 157–164.
- [2] B.O. Dubrovsky, Prog. Neuro-Psychopharmacol. 29 (2005) 169–192.
- [3] P. Gärtner, C. Novak, C. Einzinger, W. Felzmann, M. Knollmüller, G. Gmeiner, W. Schänzer, Steroids 68 (2003) 85–96.
- [4] T. Trinh, N.B. Harden, H.M. Coleman, S.J. Khan, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1668–1676.
- [5] P. Van Eenoo, W. Van Gansbeke, N. De Brabanter, K. Deventer, F.T. Delbeke, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3306–3316.
- [6] R. Aguilera, T.E. Chapman, H. Pereira, G.C. Oliveira, R.P. Illanes, T.F. Fernandes, D.A. Azevedo, F.A. Neto, J. Steroid Biochem. 115 (2009) 107–114.
- [7] A. Ishizaki, H. Kataoka, J. Pharmacol. Biol. Anal 52 (2010) 727–733.
- [8] O.J. Pozo, K. Deventer, P.V. Eenoo, F.T. Delbeke, Anal. Chem. 80 (2008) 1709–1720.
- [9] T.M. Penning, I. Mukharji, S. Barrows, P. Talalay, Biochem. J. 222 (1984) 601–611.
- [10] M. Teodorczyk, W.C. Purdy, Talanta 37 (1990) 795–800.
- [11] B. Bartling, L. Li, C.-C. Liu, Analyst 134 (2009) 973–979.
- [12] L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 11–47.
- [13] J. Wang, M. Musameh, Anal. Chem. 75 (2003) 2075.
- [14] M.D. Rubianes, G.A. Rivas, Electrochem. Commun. 5 (2003) 689–694.
- [15] M.J.A. Shiddiky, A.A.J. Torriero, Biosens. Bioelectron. 26 (2011) 1775–1787.
- [16] R.T. Kachoosangi, M.M. Musameh, I. Abu-Yousef, J.M. Yousef, S.M. Kanan, L. Xiao, S.G. Davies, A. Russell, R.G. Compton, Anal. Chem. 81 (2009) 435–442.
- [17] M.M. Rahman, M.J.A. Shiddiky, Md.A. Rahman, Y.-B. Shim, Anal. Biochem. 384 (2009) 159–165.
- [18] M.I. Álvarez-González, S.B. Saidman, M.J. Lobo-Castañón, A. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Anal. Chem. 72 (2000) 520–527.
- [19] M. Zhang, C. Mullens, W. Groski, Anal. Chem. 79 (2007) 2446–2450.
- [20] H. Zhou, Z. Zhang, P. Yu, L. Su, T. Ohsaka, L. Mao, Langmuir 26 (2010) 6028–6032.
- [21] M. Pumera, A. Merkoci, S. Alegret, Sensors Actuators B Chem. 113 (2006) 617.
- [22] J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Electrochim. Acta 53 (2008) 4007–4012.
- [23] S. Chakraborty, C. Retna Raj, Electrochem. Commun. 9 (2007) 1323.
- [24] E. Battais, B. Terouanne, J.C. Nicolas, B. Descomps, A. Crastes de Paulet, Biochimie 59 (1977) 909–917.

Gold nanoparticles/carbon nanotubes/ionic liquid microsize paste electrode for the determination of cortisol and androsterone hormones



Gold nanoparticles/carbon nanotubes/ionic liquid microsize paste electrode for the determination of cortisol and androsterone hormones

M. Moreno-Guzmán · L. Agüí · A. González-Cortés ·
P. Yáñez-Sedeño · J. M. Pingarrón

Received: 25 July 2012 / Revised: 3 September 2012 / Accepted: 5 September 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract A novel nanocomposite electrode material constituted of gold nanoparticles (AuNPs), multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and *n*-octylpyridinium hexafluorophosphate (OPPF₆) ionic liquid was prepared and checked for the development of electrochemical (bio)sensing devices. AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ paste electrodes with micrometer dimensions (500 μm, i.d.) were constructed and applied to the determination of cortisol and androsterone hormones. Regarding cortisol determination, the microsize paste electrode was used to detect 1-naphthol generated upon addition of 1-naphthyl phosphate as enzyme substrate in the competitive immunoassay between alkaline phosphatase-labelled cortisol and cortisol. Squarewave voltammetry allowed determining the hormone within the 0.1- to 10-ng/mL linear range ($r=0.990$) with a detection limit of 15 pg/mL and a EC_{50} value of 0.46 ± 0.06 ng/mL cortisol. The method was applied to the determination of cortisol in urine and serum samples containing a certified cortisol content. Moreover, a microsize enzyme biosensor prepared by bulk modification of the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrode with the enzyme 3α -hydroxysteroid dehydrogenase was used for the determination of androsterone through the amperometric detection of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. A calibration plot with a linear range between 0.1 and 120 μg/mL ($r=0.993$) and a limit of detection of 89 ng/mL were obtained. The biosensor was applied to the analysis of human serum spiked with androsterone at the 250 ng/mL concentration level.

Keywords Ionic liquids · Carbon nanotubes · Gold nanoparticles · Microsize electrode · Androsterone · Cortisol · 3α -hydroxysteroid dehydrogenase · Human serum · Urine

Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) have demonstrated their usefulness for the preparation of electrode surfaces with a high sensitivity and fouling resistance [1]. However, their scarce solubility in the majority of solvents together with a relative chemical inertness limits their applicability in the development of sensing and biosensing devices. Different routes of functionalisation and preparation of hybrids of CNTs with other materials have been proposed in order to relieve these problems and to improve their electrochemical and sensing capabilities. Functionalisation strategies involving the establishment of covalent bonding or non-covalent interactions with several materials such as organic compounds, metals, oxides or polymers have been used [2]. Furthermore, the fabrication of composites where CNTs together with biomolecules and other compounds are bulk incorporated into the electrode matrix constitutes also an adequate manner to prepare CNTs-based electrochemical biotransducers. Various configurations using mineral oil [3, 4], Teflon [5] or epoxy resin [6] as non-conducting binders have been reported in the recent literature. In this context, metal nanoparticles/CNTs composites constitute proper materials for the preparation of efficient sensors and biosensors [7]. CNTs paste electrodes prepared with gold nanoparticles (AuNPs) have demonstrated to possess special relevant properties due to the synergic combination of the AuNPs ability for adsorbing proteins with no loss of bioactivity, and the CNTs

M. Moreno-Guzmán · L. Agüí · A. González-Cortés ·
P. Yáñez-Sedeño (✉) · J. M. Pingarrón
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,
Complutense University of Madrid,
28040 Madrid, Spain
e-mail: yseo@quim.ucm.es

electrocatalytic behaviour towards the oxidation of molecules of biochemical interest. In previous papers, we have prepared various electrochemical biosensors based on AuNPs/CNTs composite electrodes using Teflon as the binding material that exhibited a high electrocatalytic activity towards reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) [8] and H_2O_2 [9] oxidation processes.

On the other hand, ionic liquids (ILs) have demonstrated to possess important electrochemical properties as they are characterised by the ionic conductivity and stability over a wide range of potential values. Therefore, composite electrodes fabricated with an IL as the binder show higher conductivity than that exhibited by other composite materials [10, 11] as well as improved ability for protein immobilisation. CNTs/ILs hybrids take advantage of the synergistic effects of both single components and the attractive cation- π or π - π interactions between them [12]. However, the high background current usually observed with this type of modified electrodes limits their wide electroanalytical applicability. Various composite electrodes based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and ILs have been reported in the recent literature, most of them consisting of composite-modified glassy carbon electrodes (GCEs) prepared by casting the hybrid mixture onto the electrode surface [13]. So, AuNPs/1-butyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate (BMIMBF₄)/MWCNTs/GCEs were prepared by layer-by-layer self-assembly and cytochrome *c* (Cyt *c*) was immobilised on the modified electrode by electrostatic adsorption; direct electrochemistry and electrocatalysis of Cyt *c* were investigated [14]. An electrochemical BMIMBF₄/MWCNTs/chitosan (CHIT)/GCE platform was used for NADH determination in the 2–26 μM concentration range using a detection potential of 300 mV [15]. Another approach involved mixing of the IL *N*-butyl-*N*-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethyl-sulfonyl) imide (C₄MPYRNTF₂) with chlorpromazine (CPZ) to prepare MWCNTs/C₄MPYRNTF₂/CPZ/GCEs for the determination of NADH. At a potential of +50 mV, a linear calibration graph between 0.8 and 20 mM NADH was obtained [16]. The same authors used recently MWCNTs/C₄MPYRNTF₂/GCE as a platform to immobilise the oxidation products of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), showing a great electrocatalytic activity towards the electrooxidation process of NADH and providing a limit of detection of 20 nM for this compound. Moreover, an ethanol biosensor based on the immobilisation of alcohol dehydrogenase was also fabricated [17]. Other species of biological interest have also been investigated using CNTs/ILs composite electrodes. For example, the voltammetric behaviour of uric acid was studied at a MWCNTs/BMIMPF₆/GCE, and a method for the determination of this compound in human urine was developed using a detection potential of 490 mV [18]. Single-

walled carbon nanotubes (SWCNTs) and BMIMPF₆ were employed to prepare a composite GCE which was applied to the determination of xanthine in the presence of uric acid and hypoxanthine, with a detection limit of 2.0 nM [19]. These authors also used BMIMPF₆/SWCNTs/GCEs for the stripping voltammetric determination of methyl-parathion and *p*-nitrophenol [20]. AuNPs/MWCNTs/1-(4-sulfonyl-butyl)-3-methylimidazole hexafluorophosphate/GCE exhibited electrocatalytic activity towards non-enzymatic oxidation of glucose in alkaline media [21]. A GCE modified by CeO₂ nanoparticles, SWCNTs and BMIMPF₆ was developed for electrochemical sensing of DNA immobilisation and hybridisation [22]. A composite material composed of SWCNT and BMIMBF₄ was also prepared for the immobilisation of d-proline dehydrogenase on GCEs and the fabrication of D-amino acids biosensors [23].

However, the number of configurations involving CNTs/ILs paste electrodes described in the literature is very scarce. Compton's group compared the voltammetric responses from various probes at graphite or CNTs paste electrodes prepared with *N*-butyl-*N*-methyl pyrrolidinium bis(trifluoromethyl-sulfonyl) imide ([C₄mpyr][NTf₂]) or mineral oil as the binder. Steady-state voltammetry at a rotating disk electrode was used to overcome the large charge currents [24]. More recently, this same group reported the fabrication of MWCNTs/*n*-octyl pyridinium hexafluorophosphate (OPPF₆) paste electrodes, which showed attractive electrochemical performances compared with graphite and mineral oil-based composites. In particular, OPPF₆ paste electrodes have shown lower background currents compared with graphite and mineral oil CPEs [25]. A SWCNTs/BMIMPF₆ paste electrode was also used to determine DNA by detecting the contents of guanine and adenine bases [26]. MWCNTs/carbon microparticles/BMIMPF₆ paste electrodes were prepared for the amperometric determination of dextromethorphan [27].

In this context, similarly to that occurs with graphite-ILs paste electrodes, the use of micro-sized electrodes provides some advantages over conventional electrodes because of the lower electroactive surface area and improved mass transport rate, which allows the signal-to-noise ratio to be enhanced as the background current is minimised [28]. Among other reported designs, a SWCNTs/1-hexyl-3-methylimidazolium hexa-fluorophosphate composite microelectrode was prepared by inserting the gel into the microhole of an etched platinum microelectrode (i.e. 50 μm), and applied to the detection of nitric oxide with a high sensitivity and wide dynamic linear range [29]. A carbon fibre microelectrode was modified with CNTs-room temperature IL and used to observe the direct electron transfer of glucose oxidase. In addition, the CNTs-based ME also exhibited electrocatalytic ability towards the oxidation of biomolecules such as dopamine, ascorbic acid and NADH [30].

In this paper, we report the preparation of a novel AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ composite for the construction of paste electrodes exhibiting good sensitivity and selectivity for the detection of 1-naphthol (1-NP) and electrocatalysis towards the oxidation process of NADH. AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ paste electrodes with micrometer dimensions (500 µm, i.d.) were used as the sensing surface for the determination of cortisol and androsterone. Cortisol is a glucocorticoid hormone which acts as a key compound in the metabolism regulation. An increase of the cortisol intracellular concentration is related with type-2 diabetes and obesity. Furthermore, it is an important stress biomarker and its determination is also important in sport medicine [31]. In spite of its interest, however, only few methods have been reported for the rapid and sensitive determination of cortisol [32]. In this paper, AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrodes were used to detect 1-NP generated upon addition of 1-naphthyl phosphate after a competitive immunoassay between alkaline phosphatase (AP)-labelled cortisol (AP-cortisol) and cortisol. On the other hand, a microenzyme biosensor based on bulk modification of AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ paste electrode with 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (3α-HSD) and NAD⁺ was prepared for the determination of androsterone (3α-hydroxy-5α-androstan-17-one). Androsterone is an intermediate hormone in the synthesis of androgens in humans. High levels of androsterone glucuronide are found in the human prostate, breast cyst fluid and ovary follicular fluid. It has a weak activity in regulating male sexual characteristics and, thus, it is considered an anabolic androgenic steroid, a kind of doping substances whose use was forbidden by the International Olympic Committee [33]. The detection of androgenic, anabolic steroids, either from endogenous or synthetic origin, is one of the major tasks in doping analysis. However, in the case of androsterone, few analytical methods, mainly based on chromatographic techniques [34], have been developed. Regarding electrochemical biosensors, only one early approach was found in the literature involving a GCE modified with 3α-HSD crosslinked with glutaraldehyde [35]. One of the main advantages of paste electrodes as it is the possibility of preparing biosensors by physical incorporation of biomolecules into the bulk composite material has been exploited in our work, thus fabricating 3α-HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ micro-sized biosensors which were applied to the determination of androsterone through the electrochemical detection of the NADH produced in the enzyme reaction.

Experimental

Reagents and solutions

MWCNTs (Ø 30±15 nm) with 95 % purity were supplied from NanoLab. OPPF₆ (Io-Li-Tec), oxidised NAD⁺ (Gerbu)

and NADH (Sigma) were also used. Murine monoclonal anti-cortisol was purchased from East Coast Bio. Cortisol labelled with AP in position 3 was obtained from Cal Bioreagents. Unlabelled cortisol (>98 %; Aldrich) and 1-naphthyl phosphate monosodium salt monohydrate (Sigma) were also used. Magnetic beads functionalised with protein A (Dynabeads® Protein A) were from Dynal Biotech ASA. Before use, the suspension of MBs was homogenised and, for each experiment, 1 µL was transferred to an Eppendorf tube and washed twice with 100 µL of 0.1 M phosphate (99 %; Scharlab) and 0.01 % Tween® 20 buffer solution of pH 8.2. A 0.1 M Tris (99 %; Scharlau) buffer solution of pH 8.5, a 50 mM Tris and 20 mM NaCl (99 %; Scharlau) buffer solution of pH 7.2, and a 0.1 M Trizma base (99 %; Sigma) and 1 mM magnesium chloride (99 %; Panreac) buffer solution of pH 9.0, were also employed. 3α-HSD, from *Pseudomonas testosteroni* H1506 (Sigma) and androsterone (3α-hydroxy-5α-androstan-17-one) (Fluka) were used. Other solvents and chemicals were of analytical reagent grade and water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system.

Samples

Urine (BioRad, Liquichek Urine Chemistry Control) containing a certified cortisol content comprised between 53.1 and 103 ng/mL concentration range and human serum with a certified cortisol concentration of 277 ng/mL (ERM-DA 192, European Reference Materials; Sigma) were used as samples to be analysed to validate the method for the determination of cortisol. Validation of the androsterone biosensor was carried out by analysing lyophilised human serum from Sigma which was spiked with androsterone at the 250 ng/mL concentration level. After spiking, samples were stored at -40 °C until they were analysed. Control serum samples (non-spiked) were also prepared in 0.1 M Tris buffer solution of pH 8.5.

Apparatus and electrodes

All electrochemical measurements were carried out using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (EcoChemie B.V.). A three electrodes 500-µL glass cell equipped with a platinum wire as the counter electrode, a home-made Ag/AgCl/3 M KCl reference electrode with a diameter of 2 mm, and the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ or the 3α-HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ enzyme biosensor as the micro-sized working electrodes were used. All experiments were performed at room temperature.

Procedures

Preparation of AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrodes

Colloidal gold (AuNPs) was prepared by adding 1.25 mL of 1 % sodium citrate solution to 50 mL of a boiling aqueous solutions containing 0.5 mL of 25 mM HAuCl₄. Gold colloids were stored in dark glass bottles at 4 °C until use. Composite AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrodes were fabricated from 24 mg MWCNTs, 76 mg OPPF₆ and 15.4 μ L colloidal gold, which were thoroughly mixed until complete homogenisation. Portions of the resulting mixture were packed into methacrylate microholders (500 μ m, i.d.) and pressed tightly. The electrical contact was made through a stainless steel wire. A cartoon scheme displaying the electrode preparation is shown in Fig. 1. Electrodes of conventional size were also prepared by packing the mixture into a Teflon holder (3 mm, i.d.) and using a stainless steel screw as the electrical contact.

Determination of cortisol

A competitive immunoassay based on the immobilisation of anti-cortisol onto protein A-magnetic particles (MBs) [32] was used (Fig. 2a). Briefly, anti-cortisol antibodies (50 μ L of a 1.5- μ g/mL solution) were immobilised onto protein A-functionalised MBs (1 μ L suspension) in an Eppendorf tube by incubation for 30 min at 37 °C. Then, the tube was held on a magnet block for 2 min, the supernatant removed, and anti-cortisol-protein A-MBs were washed twice with 100 μ L of pH 8.2 phosphate buffer solution and, once more, with Tris buffer of pH 7.2. Then, 100 μ L of a solution containing a mixture of cortisol (or the sample) and cortisol-AP were added to the Eppendorf tube and the competitive assay was allowed to proceed for 45 min incubation at 37 °C. Thereafter, the tube was placed on the magnet holding block for 2 min, the

supernatant was carefully removed and two washing steps with two 100- μ L aliquots of phosphate buffer solution of pH 7.2 were carried out. Subsequently, 45 μ L of 0.1 M Trizma buffer of pH 9.0 and 5 μ L of 50 mM 1-naphtyl phosphate solution were added, and the AP enzyme reaction was allowed to proceed place for 8 min. Finally, the supernatant solution was carefully removed and transferred to the 500- μ L electrochemical cell in which the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrode was immersed. The oxidation response of 1-NP generated in the enzyme reaction was measured by squarewave voltammetry (SWV) over the -0.15 to +0.60 V potential range.

Determination of androsterone with 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ biosensors

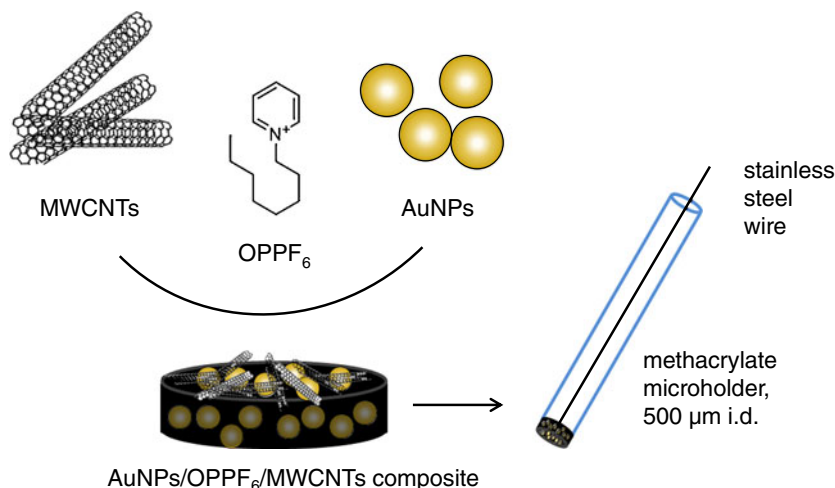
A similar procedure to that described in ‘Preparation of AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrodes’ was used for the preparation of 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ biosensors by incorporation of the enzyme 3 α -HSD to the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ paste in a ratio of 0.05 units/5 mg of paste (Fig. 2b). The determination of androsterone was performed by amperometry in stirred solutions at a detection potential of +300 mV which allowed monitoring the oxidation of the generated NADH.

Results and discussion

Preparation of AuNPs/CNTs/IL-paste electrodes

The voltammetric behaviour of MWCNTs/OPPF₆ paste electrodes prepared with and without AuNPs was compared. Figure 3 shows cyclic voltammograms recorded at conventional sized (3 mm diameter) AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ (solid lines) and MWCNTs/OPPF₆ (dashed lines) for 1 mM 1-NP (curve a), 5 mM ferrocyanide (curve b) and 1 mM catechol

Fig. 1 Scheme displaying the electrode preparation



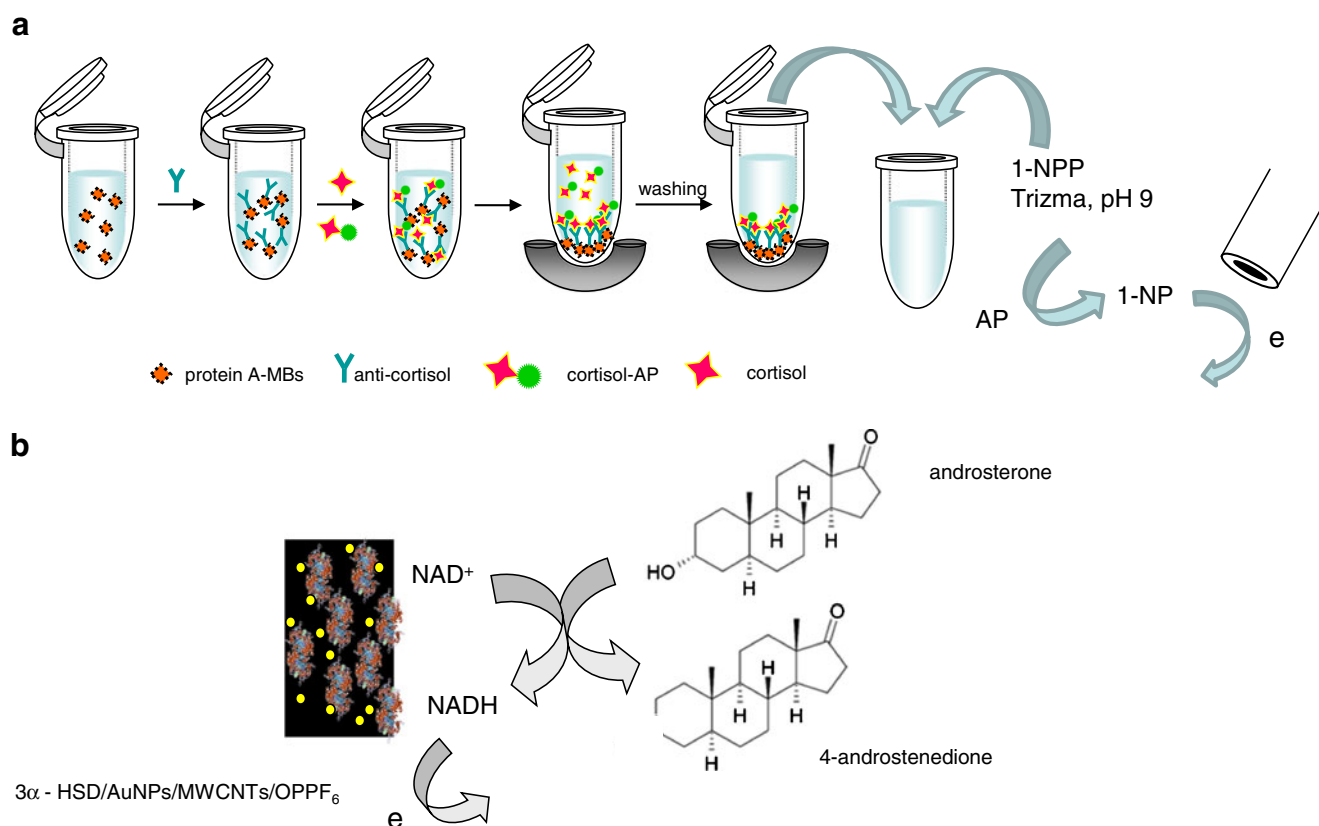
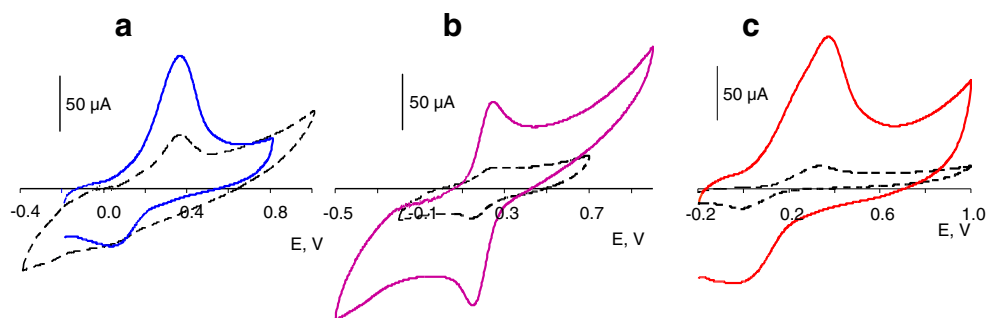


Fig. 2 Schematic display of procedures involved in the determination of cortisol using AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ paste micro-sized electrodes (**a**) and of androsterone with the 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ biosensor (**b**)

(curve c). As it can be observed, in all cases, paste electrodes prepared with AuNPs showed larger and better-defined voltammetric responses. The voltammograms obtained from 5 mM Fe(CN)₆^{3−/4−} in 0.1 M KCl solutions were used to optimise the ratio of the paste components. A small volume of colloidal gold (7.7 μ L/12 mg MWCNTs) was thoroughly mixed with MWCNTs/OPPF₆ composites prepared with different ratios in the 24/76 to 33/67 (w/w) range. The obtained results (not shown) revealed that an increase in the MWCNTs content and, therefore, in the AuNPs loading provided larger currents, most likely due to an enhanced active surface area. However, the background current also increased in a similar extent and

thus the signal-to-background current did not change appreciably with the MWCNTs content in the whole range tested. Furthermore, when the OPF₆ ratio was lower than 70 %, a large increase in the background current together with a higher instability of the nanocomposite material were observed. These results can be explained considering that the ratio of IL used as the binder decreased with increasing MWCNTs and colloidal gold contents giving rise to a more porous paste and, accordingly, to an increased background current. Taking into account these results, a 24/76 (w/w) MWCNTs/OPPF₆ ratio with 7.7 μ L of colloidal gold per 12 mg MWCNTs were selected as paste components for further work.

Fig. 3 Cyclic voltammograms recorded at: AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ (solid line) and MWCNTs/OPPF₆ (dashed line) for 1 mM 1-NP (**a**), 5 mM ferrocyanide (**b**) and 1 mM catechol (**c**); 0.05 M PBS at pH 7.4; scan rate, 100 mV/s



The composite MWCNTs/OPPF₆ was characterised by electrochemical impedance spectroscopy and compared with other composites prepared with different binders such as the IL BMIMPF₆ and Teflon. Figure 4 shows the Nyquist plots recorded for electrodes constructed with the same IL loading mentioned above and for 50:50 (w/w) MWCNTs/Teflon in 5 mM Fe(CN)₆^{4-/3-} 0.1 M KCl solution. Moreover, the EI spectra obtained for electrodes with and without AuNPs are also displayed. As it can be seen, low electron transfer resistance were measured for the CNTs/ILs composites. Furthermore, it could be concluded that a similar very low electron transfer resistance resulted with both MWCNTs/OPPF₆ and AuNPs/OPPF₆/MWCNTs electrode materials. It is also important to remark here that electrodes prepared similarly with MWCNTs/BMIMPF₆ composites gave cyclic voltammograms for 5 mM Fe(CN)₆^{4-/3-} in 0.1 M KCl exhibiting a much larger background current than that recorded with MWCNTs/OPPF₆ electrodes (results not shown), which implied worse signal-to-noise electroanalytical responses.

One of the main goals of this work was profiting the inherent advantages of micro-sized paste electrodes to minimise the background current as well as to allow electrochemical measurements to be performed in small sample volumes. Therefore, once the nanocomposite paste composition was optimised, portions of this paste were packed into methacrylate microholders (500 µm, i.d.) and micro-sized composite electrodes were prepared according to the procedure described in ‘Preparation of AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrodes’. These electrodes were suitable to be used for measurements in sample volumes as low as 500 µL, which is useful for the analysis of biological fluids. All the experiments described in the following

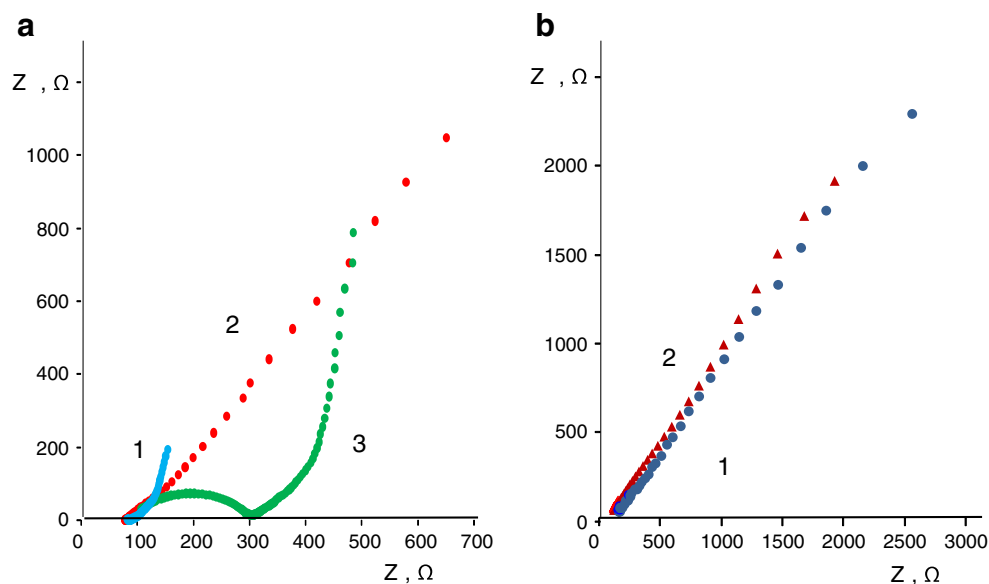
sections were performed with this kind of micro-sized electrodes and biosensors.

Determination of cortisol

As schematised in Fig. 2a, the determination of cortisol involved the electrochemical detection of 1-NP produced from the AP-catalysed hydrolysis of 1-naphtyl phosphate. SWV was selected as the detection technique due to its inherent sensitivity and rapidity. All the SWV variables were optimised considering both the net current-to-noise ratio and the resolution of the net current voltammograms. The selected values were: SW amplitude, $\Delta E_s = 20$ mV, step height, $E_{sw} = 5$ mV and frequency, $f = 8$ Hz. Figure 5 shows the SWV recorded with the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrode immersed in the 500-µL electrochemical cell containing the supernatant resulting from using the AP-cortisol-protein A-MBs conjugate (dashed line) or the AP-cortisol-anti-cortisol-protein A-MBs conjugate (solid voltammogram), 45 µL of 0.1 M Trizma buffer of pH 9.0, 5 µL of 50 mM 1-naphtyl phosphate solution and allowing the AP enzyme reaction to proceed for 8 min (see ‘Determination of cortisol’). As it can be observed, the electrochemical oxidation of the 1-NP formed in the enzyme reaction provided a well-defined SWV clearly different from the unspecific response. It is important to remark that the peak potential value was +65 mV, which is a much less positive potential than those reported at other electrodes in the same working medium. For example, the oxidation peak potential for 1-NP at a screen-printed carbon electrode was reported to be 270 mV [32].

Figure 6 shows the net peak current vs. cortisol concentration curve obtained by applying the described protocol over the 10⁻⁴–500 ng/mL cortisol concentration range. The

Fig. 4 Nyquist plots recorded from a 5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 0.1 M KCl solution at **a** (30:70) MWCNTs/BMIMPF₆ (1) and (30:70) MWCNTs/OPPF₆ (2); (50:50) MWCNTs/Teflon (3); **b** (30:70) MWCNTs/OPPF₆ (1) and (24:76)AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ (2)



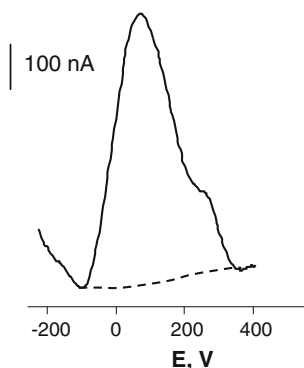


Fig. 5 Squarewave voltammograms recorded at a micro-sized AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrode from solutions into which 5 μ L of 50 mM 1-naphthyl phosphate solution were added to the AP-cortisol-protein A-MBs conjugate (*dashed line*) and to the AP-cortisol-anti-cortisol-protein A-MBs conjugate (*full line*; see text for experimental details). Supporting electrolyte was 0.1 M Trizma of pH 9.0

curve was fitted by non-linear regression, as corresponding to a competitive immunoassay, according to the equation ($r=0.995$):

$$y = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{x}\right)^h} + i_{\min}$$

where i_{\max} and i_{\min} were the maximum and minimum current values in the calibration graph: 408 ± 11 and 28 ± 9 nA, respectively. The EC_{50} value (cortisol concentration for a 50 % of competition) was 0.46 ± 0.06 ng/mL, and the Hill slope, $h=1.09 \pm 0.15$. A linear range between 0.1 and 10.0 ng/mL ($r=0.990$) and a detection limit, calculated according to $S/N=3$, of 15 pg/mL were achieved. This LOD value was notably better than those previously reported for other immunosensors, 2,000 pg/mL by SPR

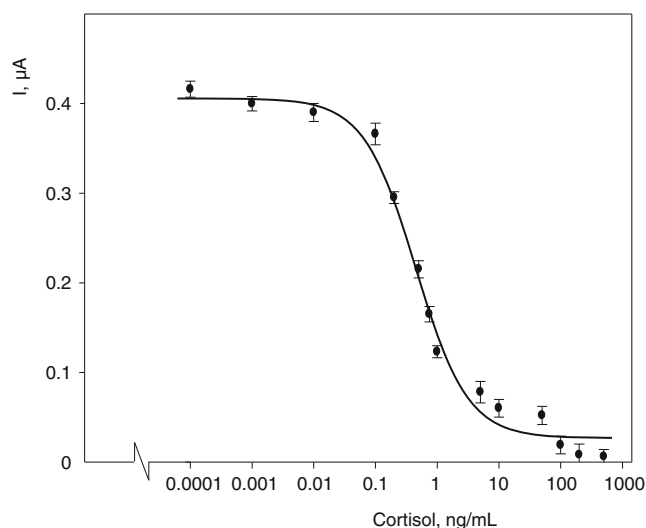


Fig. 6 Calibration plot for cortisol obtained by electrochemical detection of 1-NP at the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ micro-sized paste electrode

and covalent immobilisation of anticortisol onto 11-mercaptopundecanoic acid SAM with EDC-NHS [36] or 72 pg/mL by a non-competitive colorimetric ELISA with cortisol-poly(L-Lys) conjugates and HRP cortisol [37]. The reproducibility of the responses was checked by measuring the voltammetric response to 0 ng/mL cortisol with the same AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ electrode and using five different immunoconjugates prepared simultaneously. The RSD value for i_p was 6.5 %. Furthermore, measurements carried out with eight AP-cortisol-anti-cortisol-protein A-MBs conjugates prepared in different days yielded a RSD value of 7.2 %.

Validation of the methodology was performed by analysing urine and serum samples with a certified content of cortisol. Urine samples were purchased from BioRad (Liquichek Urine Chemistry Control) and contained a certified concentration of hormone comprised between 53.1 and 103 ng/mL. The determination of cortisol could be accomplished by simple interpolation into the calibration plot constructed with cortisol standards since the slope value of the linear range for this calibration plot (-151 ± 1 nA) was not statistically different from that obtained in urine, -148 ± 6 nA. Both undiluted urine and 10:1 and 100:1 diluted urine with Tris-HCl buffer, pH 7.2, were analysed yielding values of 59.1 ± 1.2 , 0.61 ± 0.08 and 5.9 ± 0.3 ng/mL cortisol, respectively. These results provided a mean value of 59.7 ± 0.5 ng/mL cortisol which is within the range of certified analyte concentration in the sample. Regarding the serum sample (ERM-DA 192, European Reference Materials) from Sigma, it contained a certified cortisol concentration of 277 ± 5 ng/mL. In this case, a calibration graph constructed from reconstituted diluted serum with the Tris-HCl buffer provided a slope value of -152 ± 1 nA, which practically coincided with the value obtained with cortisol standards. Therefore, no significant matrix effect was observed again. The analysis by quintuplicate of the serum sample gave a mean concentration of 270 ± 5 ng/mL cortisol. The Student's t test provided a t_{exp} value of 0.96, which is lower than the tabulated one, 1.76, for a significance level of 0.05, this revealing that there were no significant differences between both concentration values.

Determination of androsterone using a AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ micro-sized paste enzyme biosensor

One of the most well known advantages of paste electrodes is the simple preparation of biosensors by incorporation of biomolecules into the bulk paste matrix. Accordingly, an amperometric biosensor for the determination of androsterone was constructed by physical inclusion of the 3 α -HSD enzyme into the AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ composite paste as described in 'Determination of androsterone with 3 α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ biosensors'. The applied methodology involved the amperometric measurement of

the electrochemical oxidation corresponding to the NADH formed in the enzyme reaction with 3α -HSD at the composite electrode (Fig. 2b). A detection potential of 300 mV was chosen as a compromise between an adequate sensitivity and a good selectivity in the analysis of real samples (results not shown). The 3α -HSD enzyme loading into the electrode matrix was optimised. For this purpose, the amperometric responses for 1 $\mu\text{g/mL}$ androsterone in the presence of 50 mM NAD^+ were measured with different micro-sized 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ paste biosensors prepared with enzyme amounts ranging between 0 and 0.2 units/5 mg of paste. The obtained results (not shown) indicated that the best signal-to-background current ratio was obtained for biosensors prepared with 0.05 units of enzyme/5 mg of paste, this being the enzyme loading chosen for further experiments. Using these conditions, the effect of the NAD^+ concentration in the analytical solution was also checked. Amperometric measurements for 1 $\mu\text{g/mL}$ androsterone in solutions containing between 25 and 500 mM cofactor showed that the biosensor response increased with the NAD^+ concentration up to 50 mM and remained practically constant for higher concentrations. Accordingly, 50 mM was selected as the optimum value.

Under the optimised working conditions stated above, a calibration plot for androsterone exhibiting a range of linearity ($r=0.993$) between 0.1 and 120 $\mu\text{g/mL}$ ($0.34\text{--}413\text{ }\mu\text{M}$) with a slope value of $7.8\pm 0.4\text{ nA mL}/\mu\text{g}$ ($2.2\pm 0.1\text{ }\mu\text{A}/\text{mM}$) was obtained with the 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ biosensor (Fig. 7). This slope value (sensitivity) is more than seven times higher than that reported using a GCE modified with 3α -HSD cross-linked with glutaraldehyde and applying a detection potential as positive as +600 mV

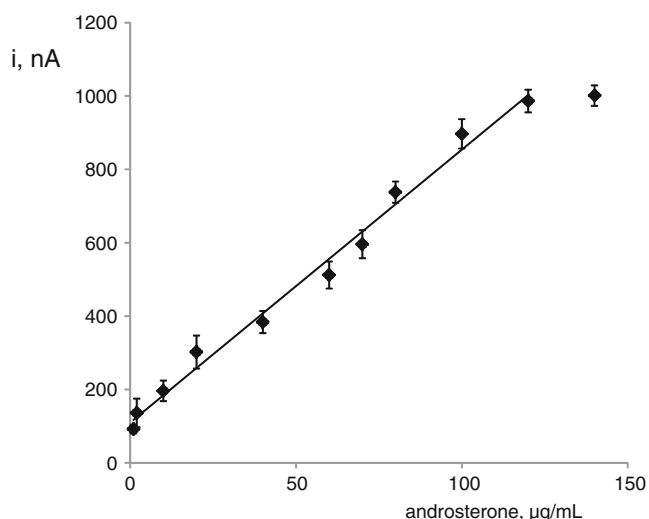


Fig. 7 Calibration plot for androsterone obtained at the 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ biosensor

[35] despite the much smaller surface area of the micro-sized bioelectrode (0.196 mm^2 vs. 6.7 mm^2). Furthermore, the range of linearity extended over more than four decades. The detection limit, $0.09\text{ }\mu\text{g/mL}$, was calculated according to the $3s_b/m$ criterion, where m was the slope of the linear portion in the calibration graph, and s_b was estimated as the standard deviation ($n=10$) of the amperometric signals measured for different androsterone solutions at the lowest concentration level of the calibration graph ($0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$).

An inherent advantage of the composite biosensor designs is their remarkable stability, as well as the possibility of renewing the electrode surface by simple polishing. Different aspects regarding the stability of the developed biosensor were evaluated. Firstly, successive amperometric measurements were performed for 0.1 and $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ androsterone with a single 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ micro-sized biosensor whose surface was polished with a non-abrasive paper between the successive measurements. RSD values of 5.8 and 6.8 % ($n=5$) were obtained, respectively. Moreover, the reproducibility of the amperometric responses obtained with five different biosensors for the same androsterone concentration levels was also evaluated. Measurements carried out in different days produced RSD values of 7.1 and 6.4 %, respectively.

The enzyme reaction at the 3α -HSD/AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ composite biosensor fitted well into a Michaelis–Menten kinetics, as it was apparent from the value of the “ x ” parameter (0.98) calculated from the corresponding Hill’s plot ($[\log(i_{\text{max}}/i) - 1]$) vs. the log of androsterone concentration. An apparent Michaelis–Menten constant (K_{app}^M) of $173\text{ }\mu\text{M}$ was calculated from the corresponding Lineweaver–Burk plot. This value was slightly lower than that reported for the immobilisation of 3α -HSD onto a GCE, $189\text{ }\mu\text{M}$ [35], which reflected a relatively good affinity of the enzyme for the substrate upon immobilisation of the biomolecule by physical incorporation into the AuNPs/CNTs/liquid ionic composite.

The usefulness of the biosensor was evaluated by analysing human serum spiked with androsterone at a 250-ng/mL concentration level. The quantification of androsterone could be accomplished by interpolation of the current measured for the sample into the calibration plot constructed with androsterone standards since the slope value of the calibration graph prepared in serum ($7.7\pm 0.3\text{ nA mL}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$) was not significantly different to that obtained with standards. Repetitive analyses by quintuplicate yielded a mean concentration value of $248\pm 10\text{ ng/mL}$, with recoveries ranging between 95 and 104 %. These results showed fairly well the absence of significant interference from other compounds present in the human serum, thus confirming the usefulness of the developed methodology.

Conclusions

A novel AuNPs/MWCNTs/OPPF₆ composite paste electrode with micrometer dimensions (500 µm, i.d.) combining synergistically the AuNPs ability for adsorbing proteins with no loss of bioactivity, the CNTs electrocatalytic behaviour towards the oxidation of molecules of biochemical interest, and the high conductivity of the IL used as the binder, was constructed. The composite electrode material was shown to be suitable for the voltammetric determination of cortisol upon an immunoassay involving functionalised magnetic beads, and the amperometric determination of androsterone through the preparation of a composite enzyme microelectrode by incorporation of the enzyme 3α-HSD into the electrode matrix. The use of micro-sized paste electrodes allowed minimising background current as well as performing electrochemical measurements in small sample volumes (as low as 500 µL) with no apparent worsening of the analytical behaviour of the developed sensing devices due to the small transducer dimensions, which can be useful for the analysis of biological fluids.

Acknowledgments Financial support from the Ministerio de Economía y Competitividad, Project CTQ2012-35041 and Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642 (AVANSENS) is gratefully acknowledged.

References

- Agüí L, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2008) *Anal Chim Acta* 622:11–47
- Spitalskya Z, Tasis D, Papagelis K, Galiotis C (2010) *Prog Polym Sci* 35:357–401
- Rubianes MD, Rivas GA (2005) *Electroanalysis* 17:73–78
- Valentini F, Amine A, Orlanducci S, Terranova M, Palleshi G (2003) *Anal Chem* 75:5413–5421
- Wang J, Musameh M (2003) *Anal Chem* 75:2075–2079
- Pumera M, Merkoci A, Alegret S (2006) *Sens Actuators B Chem* 113:617–622
- Jiang L, Gao L (2003) *Carbon* 41:2923–2929
- Manso J, Mena ML, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2008) *Electrochim Acta* 53:4007–4012
- Manso J, Mena ML, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2007) *J Electroanal Chem* 603:1–7
- Pedano ML, Rivas GA (2004) *Electrochem Commun* 6:10–16
- Opallo M, Lesniewski A (2011) *J Electroanal Chem* 656:2–16
- Tunckol M, Durand J, Serp P (2012) *Carbon* 50:4303–4334
- Shiddiky MJA, Torriero AAJ (2011) *Biosens Bioelectron* 26:1775–1787
- Xiang C, Zou Y, Sun L-X, Xu F (2008) *Electrochem Commun* 10:38–41
- Wang Q, Tang H, Xie Q, Tan L, Zhang Y, Li B, Yao S (2007) *Electrochim Acta* 52:6630–6637
- Salimi A, Lasghari S, Noorbakhash A (2010) *Electroanalysis* 22:1707–1716
- Teymourian H, Salimi A, Hallaj R (2012) *Talanta* 90:91–98
- Yan Q, Zhao F, Li G, Zeng B (2006) *Electroanalysis* 18:1075–1080
- Xiao F, Ruan C, Li J, Liu L, Zhao F, Zeng B (2008) *Electroanalysis* 20:361–366
- Fan S, Xiao F, Liu L, Zhao F, Zeng B (2008) *Sens Actuators B* 132:34–39
- Zhu H, Lu X, Li M, Shao Y, Zhu Y (2009) *Talanta* 79:1446–1463
- Zhang W, Yang T, Zhuang X, Guo Z, Jiao K (2009) *Biosens Bioelectron* 24:2417–2422
- Tani Y, Itoyama Y, Nishi K, Wada C, Shoda Y, Satomura T, Sakuraba H, Ohshima T, Hayashi Y, Yabutani T, Motonaka J (2009) *Anal Sci* 25:919–923
- Kachooangi RT, Wildgoose GG, Compton RG (2007) *Electroanalysis* 19:1483–1489
- Kachooangi RT, Musameh MM, Abu-Yousef I, Yousef JM, Kanan SM, Xiao L, Davies SG, Russell A, Compton RG (2009) *Anal Chem* 81:435–442
- Zhang X, Jiao K, Wang X (2008) *Electroanalysis* 20:1361–1366
- Heli H, Majdi S, Jabbari A, Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi AA (2010) *J Solid State Electrochem* 14:1515–1523
- Musameh M, Wang J (2008) *Anal Chim Acta* 606:45–49
- Li CM, Zang J, Zhan D, Chen W, Sun CQ, Teo AL, Chua YT, Lee VS, Moolchhala SM (2006) *Electroanalysis* 18:713–718
- Liu Y, Zou X, Dong S (2006) *Electrochem Commun* 8:1429–1434
- Kumar A, Aravamudhan S, Gordic M, Bhansali S, Mohapatra SS (2007) *Biosens Bioelectron* 22:2138–2144
- Moreno-Guzmán M, Eguílaz M, Campuzano S, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM (2010) *Analyst* 135:1926–1933
- Saudan C, Baume N, Mangin P, Saugy M (2004) *J Chromatogr B* 810:157–164
- Trinh T, Harden NB, Coleman HM, Khan SJ (2011) *J Chromatogr A* 1218:1668–1676
- Teodorczyk M, Purdy CT (1990) *Talanta* 37:795–800
- Frasconi M, Mazzarino M, Botré F, Mazzei F (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:2151–2159
- Anfossi L, Tozzi C, Giovannoli C, Baggiani C, Giraudi G (2002) *Anal Chim Acta* 468:315–321

A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles





Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles

María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño*, José M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2011

Received in revised form 17 February 2011

Accepted 28 February 2011

Available online 5 March 2011

Keywords:

Prolactin

Immunosensor

Electrochemical

Magnetic particles

Screen-printed electrodes

ABSTRACT

A novel electrochemical immunosensor was developed for the determination of the hormone prolactin. The design involved the use of screen-printed carbon electrodes and streptavidin-functionalized magnetic particles. Biotinylated anti-prolactin antibodies were immobilized onto the functionalized magnetic particles and a sandwich-type immunoassay involving prolactin and anti-prolactin antibody labelled with alkaline phosphatase was employed. The resulting bio-conjugate was trapped on the surface of the screen-printed electrode with a small magnet and prolactin quantification was accomplished by differential pulse voltammetry of 1-naphtol formed in the enzyme reaction using 1-naphtyl phosphate as alkaline phosphatase substrate. All variables involved in the preparation of the immunosensor and in the electrochemical detection step were optimized. The calibration plot for prolactin exhibited a linear range between 10 and 2000 ng mL⁻¹ with a slope value of 7.0 nA mL ng⁻¹. The limit of detection was 3.74 ng mL⁻¹. Furthermore, the modified magnetic beads–antiprolactin conjugates showed an excellent stability. The immunosensor exhibited also a high selectivity with respect to other hormones. The analytical usefulness of the immunosensor was demonstrated by analyzing human sera spiked with prolactin at three different concentration levels.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone of molecular mass 23 000 with a single chain of 199 residues and three disulfide-bonded loops. With more than 100 different effects documented, it is one of the most versatile hormones in terms of biological actions [1] although it is best known for stimulation of lactation and regulatory roles in the growth and differentiation of the mammary gland and in reproduction. The human hormone is produced mainly by the lactotrope cells of the anterior pituitary. PRL circulates in serum in multiple forms of different molecular sizes identifiable by gel filtration chromatography, although monomeric prolactin is the main form (85–95%). Post-translational modified variants, such as cleaved, phosphorylated and glycosylated PRL are also present in the hypophysis [2]. The determination of prolactin in women serum is needed in the case of menstrual disturbances, galactorrhoea, hypogonadism or infertility among other diseases. When hyperprolactinemia is confirmed (>20 ng mL⁻¹ PRL on two occasions [3]), the possibility of a prolactinoma must be investigated.

Various immunoassays have been described in the literature for the determination of PRL. For example, an enzyme immunoassay with colorimetric titration for PRL determination in blood plasma

on microtitreplates using the biotin–streptavidin amplification system and second antibody coating technique was developed and applied during milk let down and cyclicity in mithuns (*Bos frontalis*), a semi-wild ruminant. Biotin was coupled to prolactin and used to bridge between streptavidin peroxidase and immobilized antiserum in competitive assay [4]. A similar configuration was applied by the same group to prolactin quantification in buffalo plasma [5], and for the determination of oxytocin and prolactin in yak plasma [6].

However, regarding immunosensors, only one configuration has been found in the literature until now. This consists on a multi-analyte device for the determination of follitropin, human chorionic gonadotropin and prolactin in human serum. The immunosensor device is provided with different antibodies which react specifically with the analytes when the sample is introduced into a capillary along with a mixture of analyte-specific biotinylated antibodies. The coated and the detection antibodies react with different epitopes of the analytes in the sample to form a 'sandwich'. The system employed fluorometric detection of the reaction between the immobilized biotinylated antibody and streptavidin labelled with R-phycoerythrin [7].

In this work, we describe for the first time an electrochemical immunosensor for the quantification of PRL. The developed configuration involves the use of screen-printed carbon electrodes (SPCE) and functionalized magnetic beads (MBs). MBs have widely demonstrated to constitute a powerful and versatile tool

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944317.

E-mail address: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).

for the development of efficient immunosensing platforms [8]. They respond to an applied magnetic field and have a large active surface area which favours the immobilization of a high concentration of biomolecules onto the transducer surface, as well as a decrease of matrix effects [9]. MBs have been successfully applied in different immunosensing strategies for the determination of various compounds in food [10], antibiotics [9], polychlorinated biphenyls (PCBs) [11,12], polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [13], atrazine [14], cortisol [15] and testosterone [16]. The immunosensor design described in this work implies immobilization of biotinylated anti-prolactin antibodies onto streptavidin-modified magnetic particles and a sandwich-type immunoassay involving prolactin and anti-prolactin labelled with alkaline phosphatase (AP). The resulting bioconjugate was trapped on the surface of the SPCE with a small magnet. This simple methodology allowed measurements to be carried out with small volumes of solutions giving rise to a high concentration of reagents on the transducer surface and, therefore, enabling the achievement of low detection limits. The quantification of PRL was accomplished by differential pulse voltammetric (DPV) determination of 1-naphtol formed upon 1-naphtyl phosphate additions. The packing of MBs on the SPCE surface also implied that the enzyme reaction product was generated very close to the electrode surface, thus allowing the steady-state to be reached rapidly (which implies faster measurements), and minimizing diffusion limitations of the electroactive species.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Mouse monoclonal anti-prolactin biotinylated (0.70 mg mL^{-1}) was purchased from Hytest, Turku, Finland. Mouse monoclonal anti-human prolactin labelled with alkaline phosphatase (1:10 dilution) and purified recombinant human Prolactin (0.1 mg) was obtained from Immunometrics, London, UK. 1-Naphthyl phosphate monosodium salt monohydrate was from Sigma. Diluted solutions of biotinylated anti-prolactin were prepared in B&W 0.1 M phosphate (Scharlab, 99%) and 0.01% Tween[®] 20 (Aldrich) buffer solution of pH 7.5. A 50 mM Tris (Scharlau, 99%) and 20 mM NaCl (Scharlau, 99%) buffer solution of pH 7.2, and a 0.1 M Trizma base (Sigma, 99%) and 1 mM magnesium chloride (Panreac, 99%) buffer solution of pH 9.0, were also employed. 3000 ng mL^{-1} solutions of unlabelled prolactin in Tris buffer solution of pH 7.2 were prepared. Diluted 1:500 stock anti-prolactin-AP solutions were prepared daily in the same buffer. More diluted solutions of AP-labelled and unlabelled anti-prolactin were prepared daily with Tris buffer solution of pH 7.2. 0.05 M solutions of 1-naphthyl phosphate were also prepared daily in Trizma base buffer of pH 9. 0.5 mg mL^{-1} stock methanolic solutions of corticosterone, progesterone, testosterone, human growth hormone (hGH), estriol, estradiol, cortisol and melatonin were also prepared and, from these, 2000 ng mL^{-1} , 1000 ng mL^{-1} and 100 ng mL^{-1} stock and more diluted solutions were prepared in Tris buffer solution of pH 7.2 to perform the interferences study. Magnetic beads (MBs) functionalized with streptavidin (Dynabeads[®] streptavidin) were from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway). Before use, MB suspensions were homogenized and, whenever they were used, $2 \mu\text{L}$ were transferred to an eppendorf vial and washed twice with 100 μL B&W buffer solution of pH 7.5.

2.2. Samples

The sample analyzed was lyophilized human serum (Sigma) spiked with PRL. PRL concentrations tested were 10, 100 and

200 ng mL^{-1} . The solid serum was reconstituted in 1 mL of PRL solution by mixing up to total dissolution, aliquoted and frozen at -40°C until assayed. Control serum samples (unspiked) were prepared in 1 mL of Tris buffer solution of pH 7.2, and dilutions of PRL were made with this control serum stock.

2.3. Apparatus and electrodes

All electrochemical measurements were carried out with a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.). SPCEs (4 mm diameter) were purchased from DropSens (Oviedo, Spain) and used as the working electrodes. These electrodes include a silver pseudoreference electrode and a carbon counter electrode. All experiments were performed at room temperature.

A P-Selecta ultrasonic bath, an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A.), and a P-Selecta Agimatic magnetic stirrer, all distributed by Scharlab, Madrid, Spain, were also used. A neodymium magnet (AIMAN GZ, Madrid, Spain) was used to control the attraction of magnetic beads to the SPCE surface. The magnetic separation during washing steps was performed with a magnetic separator Dynal MPC-S (product no. 120.20, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway).

2.4. Immunoassay procedure

$2 \mu\text{L}$ of the streptavidin-functionalized MBs suspension were transferred to an eppendorf tube and re-suspended in $50 \mu\text{L}$ of a 17.5 mg mL^{-1} antiprolactin-biotinylated solution prepared in Tris buffer of pH 7.2. After 45 min incubation at 37°C under stirring, the tube was placed on the magnet holding block for 2 min. Once MBs were deposited on the bottom of the tube, the supernatant was removed and the beads bearing the antibodies were washed twice with $100 \mu\text{L}$ of B&W buffer solution of pH 7.5 and, once more, with Tris buffer of pH 7.2. Each washing step consisted of a re-suspension of the beads in the washing solution and gentle stirring for 1 min (up to homogenization) followed by separation with the magnet for 2 min and removing of the solution. Thereafter, the antiprolactin-biotinylated-streptavidin-MBs were re-suspended in $50 \mu\text{L}$ of PRL and, after 30 min incubation at 37°C under stirring the tube was placed on the magnet holding block for 2 min. The supernatant was removed, and two washing steps with two $100 \mu\text{L}$ portions of Tris buffer solution of pH 7.2 were carried out. Subsequently, the prolactin-antiprolactin-biotinylated-streptavidin-MBs were re-suspended in $100 \mu\text{L}$ of the 1:500 diluted antiprolactin-AP solution. Then, the supernatant was removed, and two more washing steps with two $100 \mu\text{L}$ portions of Tris buffer solution of pH 7.2 were performed. Then, the AP-antiprolactin-prolactin-antiprolactin-biotinylated-streptavidin-MBs were re-suspended in $45 \mu\text{L}$ of Trizma buffer of pH 9.0 and transferred onto the surface of the SPCE. This transfer was made keeping the SPCE horizontal and placing the neodymium magnet on the bottom part of the electrode to localize in a reproducible way the MBs onto the working surface, thus avoiding variations in bead layer thickness or spreading area on the electrode surface between different measurements. Then, $5 \mu\text{L}$ of 0.05 M 1-naphthyl phosphate solution were deposited on the electrode and allowed to react for 8 min. Differential pulse voltammograms were recorded over the -0.15 to $+0.60 \text{ V}$ potential range. Each experiment in all the studies was carried out with a new prepared sensor.

2.5. Sample analysis

The ampoules containing lyophilized serum samples were stored at 8°C . When used, the solid from each ampoule was recon-

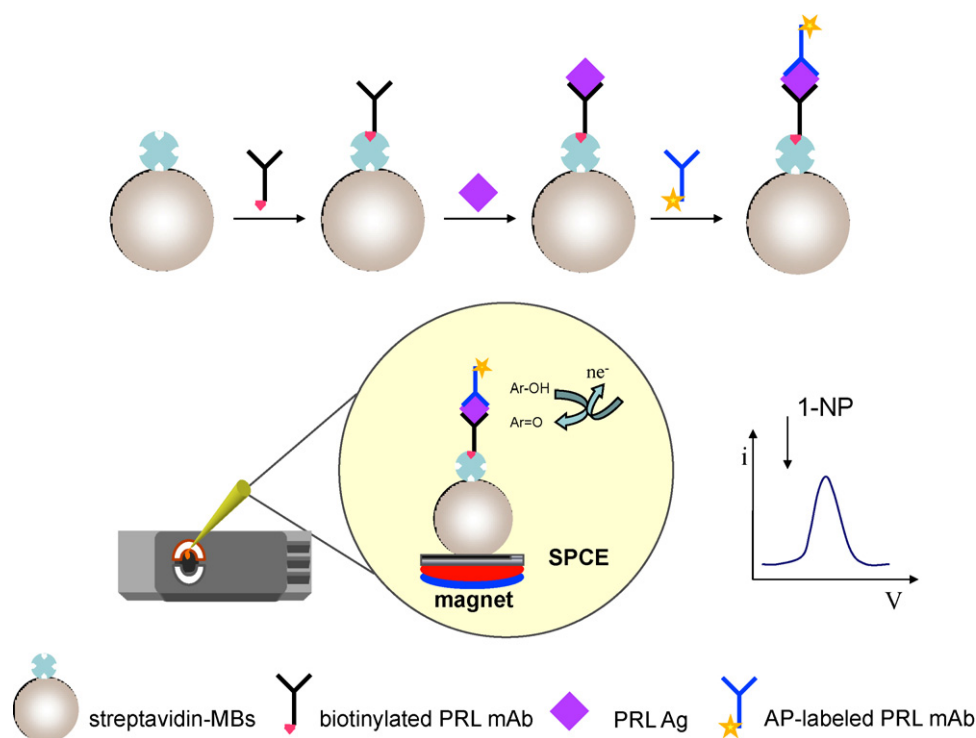


Fig. 1. Schematic display of the reactions and protocols involved in the development of disposable electrochemical immunosensors for prolactin using functionalized magnetic beads.

stituted in 1 mL of the adequate PRL solution by gentle stirring and mixing up to total dissolution. PRL determination was performed by applying the procedure described above. The peak current values measured by DPV from serum samples were interpolated into the linear portion of the calibration plot obtained with PRL standard solutions.

3. Results and discussion

Fig. 1 depicts schematically the fundamentals of both the immunoreaction performed on the functionalized MBs, their transfer to the SPCE and the electrochemical transduction strategy employed. Biotinylated anti-prolactin antibodies were firstly attached to streptavidin-modified MBs. After incubation in the analyte solution, a sandwich-type configuration using anti-PRL antibodies labelled with AP was employed. The MBs modified with the bioconjugates were localized on the surface of the SPCE with a small magnet, and the subsequent addition of 1-naphthyl phos-

phate as AP-substrate produced 1-naphtol whose electrochemical oxidation was quantified by DPV at the SPCE. All the incubation or washing steps implied separation of modified MBs from the corresponding solutions using a small neodymium magnet.

3.1. Optimization of the experimental variables involved in the immunosensor response to prolactin

All the variables concerning the preparation and the electrochemical performance of the immunosensor were optimized. These include the MBs loading on the SPCE, the amount of immobilized anti-PRL antibodies and the corresponding incubation time with MBs, the anti-PRL-AP conjugate concentration and incubation time, the 1-naphthyl phosphate, used as the AP enzyme substrate, concentration and the time that the enzyme reaction was let to proceed.

Firstly, different immunosensors were constructed by applying the procedures described in Section 2 using different amounts

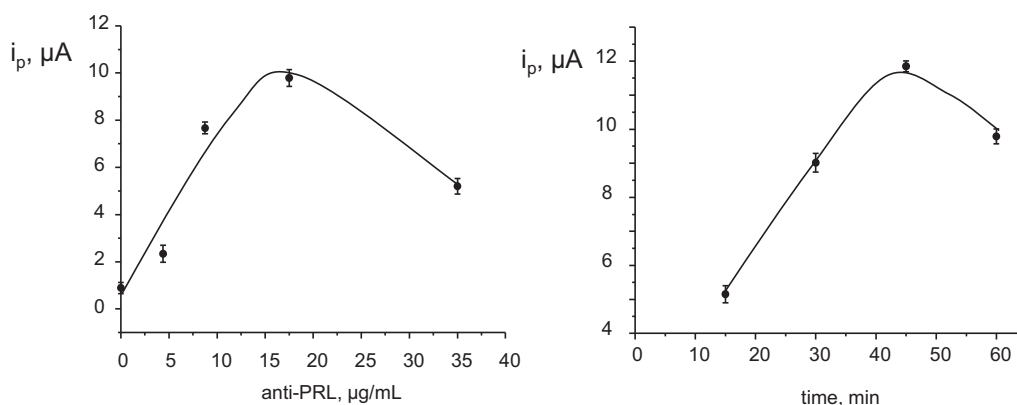


Fig. 2. Effect of the amount of anti-prolactin immobilized (a), and the incubation time of $17.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-prolactin (b), on the current response at SPCEs modified with $2 \mu\text{L}$ ($20 \mu\text{g}$) MBs, in the presence of 1000 ng mL^{-1} prolactin and 1:100 dilution anti-prolactin-AP.

of streptavidin-functionalized MBs and, in all cases, 50 μL of 4.375 $\mu\text{g mL}^{-1}$ biotinylated anti-PRL, 50 μL of 1000 ng mL^{-1} PRL and 50 μL of 1:100 diluted anti-PRL-AP solutions. The influence of the MBs loading on the 1-naphtol DP voltammetric signal was evaluated in the 1–5 μL of MBs suspension (10–50 μg) range. An increase in the peak current was produced with the MBs loading up to 20 μg (results not shown). However, larger MBs amounts gave rise to lower voltammetric responses most likely due to the higher electron transfer resistance occurring when large modified-MBs loadings were employed. Accordingly, an MBs loading of 20 μg was selected for further work.

On the other hand, it is clear that the amount of antibody immobilized onto the MBs should play a key role in the analytical characteristics concerning both the range of linearity and sensitivity of competitive immunoassays. The influence of the amount of anti-PRL antibodies was evaluated by immobilizing in every experiment 50 μL of different biotinylated anti-PRL solutions prepared in the 0–35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range. 1000 ng mL^{-1} PRL solutions and 50 μL from a 1:500 dilution anti-PRL-AP were employed in this study. Fig. 2a shows as the DPV peak current for 1-naphtol increased sharply with the immobilized anti-PRL concentration up to 17.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Larger antibody loadings produced a decrease in the voltammetric signal indicating saturation of streptavidin-MBs binding sites. The incubation time of anti-PRL with the functionalized-MBs was also optimized (Fig. 2b) showing a maximum i_p value for 45 min. According to these optimization studies, a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-PRL concentration and an incubation time of 45 min, which seems to be enough to allow bonding of all the biotinylated-antibodies to the streptavidin-functionalized MBs, were selected for further work.

The anti-PRL-AP conjugate concentration was optimized by testing the electrochemical response of different immunosensors prepared with different AP-labelled anti-PRL loadings in the 1:1000 to 1:100 dilution range. Results obtained (not shown) showed a slight increase in the DPV peak current as the concentration of anti-PRL-AP conjugate increased up to a 1:500 dilution. Larger concentrations produced practically constant peak current values indicating saturation of the antibodies binding sites. Accordingly, a 1:500 conjugate dilution was chosen. Optimization of the incubation time at 37 $^{\circ}\text{C}$ led us to select 30 min for this step.

On the other hand, 1-naphtyl phosphate was selected as the alkaline phosphatase substrate, considering the relevant advantages that it provides in terms of a low detection potential and a high sensitivity for the determination of 1-naphtol at SPCEs [15]. The influence of 1-naphtyl phosphate concentration on the DPV responses was evaluated in the 5.0×10^{-5} to 0.01 M range. The i_p values raised rapidly with the substrate concentration up to 5.0×10^{-3} M, and then slightly decreased. Accordingly, a 5.0×10^{-3} M 1-naphtyl phosphate concentration was selected to ensure that the enzyme reaction rate depended only on the enzyme concentration.

The enzyme reaction with 1-naphtyl phosphate was performed at pH 9.0, which corresponded to the optimum AP activity [17]. The last optimized variable consisted of the time that the enzyme hydrolysis reaction was let to proceed. Considering both the achieved sensitivity and a short analysis time as the selection criteria, the time for 1-naphtyl phosphate hydrolysis was fixed to 8 min (results not shown).

3.2. Analytical characteristics for prolactin determination

Fig. 3 shows the calibration plot for PRL constructed by DPV under the optimized conditions stated above. Error bars were calcu-

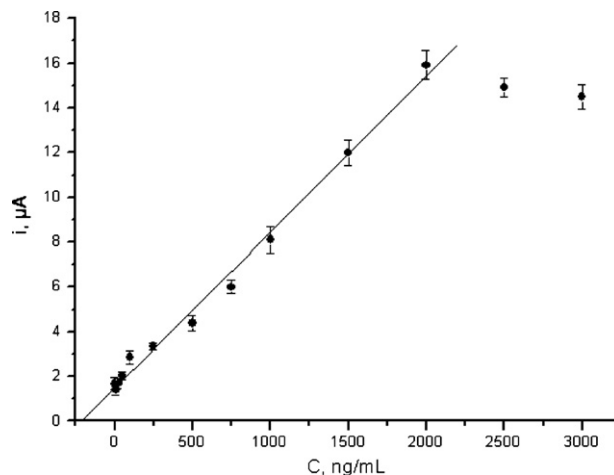


Fig. 3. Calibration plot for prolactin obtained with the biotinylated anti-prolactin-streptavidin-MBs-SPCE immunosensor by differential pulse voltammetry.

lated considering the measurements obtained with three different immunosensors and, for all the displayed points, the error was below 10%. As it happens for a sandwich-type assay, the peak current increased with increasing the PRL concentration. The dynamic range of linearity was 10 and 2000 ng mL^{-1} ($r=0.993$) which is much wider than that reported using the multi-analyte device commented in the Introduction section and fluorometric detection [7]. In this case, the range of linearity covered only one order of magnitude in PRL concentration (from 10 to approximately 100 ng mL^{-1}). The slope value of the linear portion in the calibration plot was 7.0 nA mL ng^{-1} and the limit of detection, calculated as $3s_{y/x}/m$ where $s_{y/x}$ is the statistics that estimates the random errors in the y-direction [18] and m is the slope value mentioned above, was 3.74 ng mL^{-1} . This value is similar to that reported in reference [7], 1.3 ng mL^{-1} , although it was calculated using a less restrictive criterion (2 s).

The reproducibility of the voltammetric measurements was evaluated by carrying out assays for 10, 100, 1000 and 2000 ng mL^{-1} PRL solutions on the same day and on different days with different immunosensors prepared for each test. Relative standard deviation (RSD) values ranged between 3 and 8% ($n=5$) for lectures obtained during the same day, and between 7 and 9% ($n=5$) for measurements performed on different days, thus demonstrating the suitability of the immunosensor preparation procedure.

On the other hand, the stability of the streptavidin-MBs-biotinylated anti-PRL conjugates was tested. In order to do that, different eppendorf tubes containing the same amount of conjugate were prepared on the same day and stored in a refrigerator at 4 $^{\circ}\text{C}$. Thereafter, each conjugate was used to measure

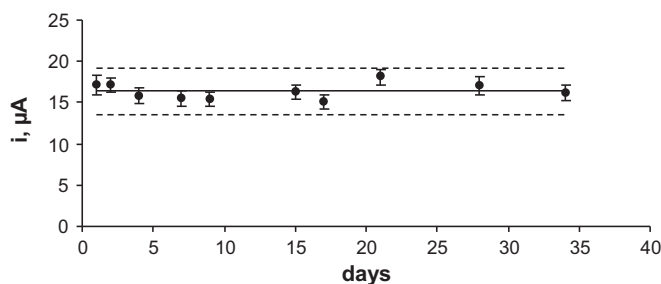


Fig. 4. Control chart constructed for streptavidin-MBs-biotinylated anti-PRL conjugates. Each point corresponds to the mean value for three successive measurements of 2000 ng mL^{-1} prolactin.

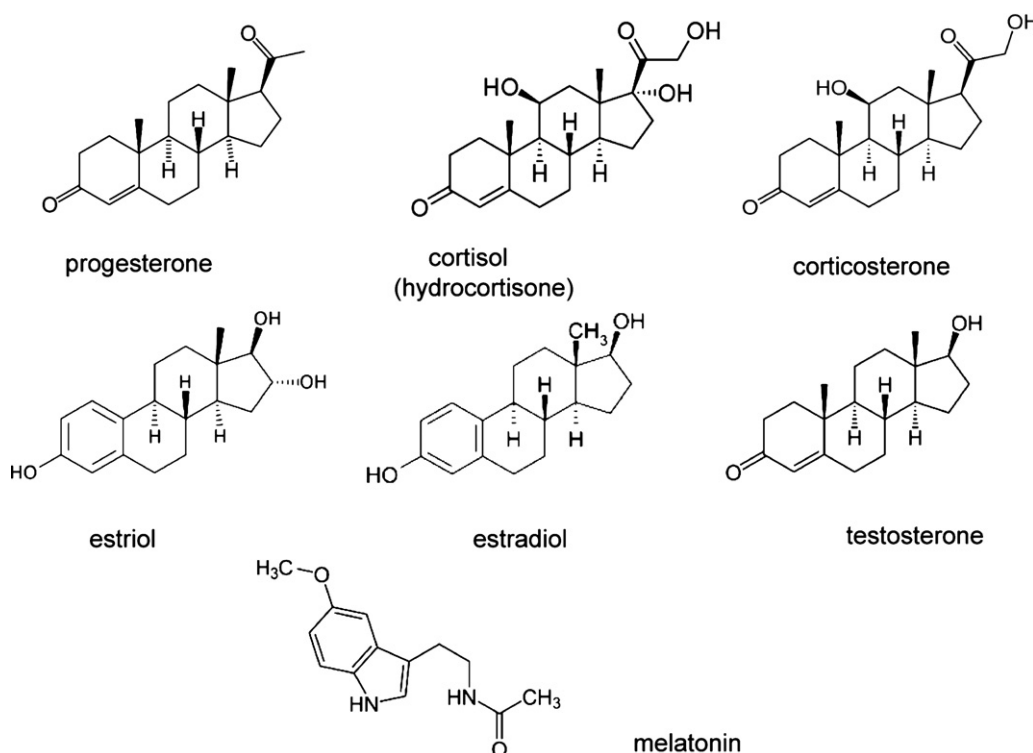


Fig. 5. Chemical structures of potential interfering compounds for prolactin.

the analytical signal for 2000 ng mL^{-1} PRL during a period of time of 34 days. The results obtained are displayed in Fig. 4, where each point corresponds to the mean value for three successive measurements. As it can be seen, the immunosensor response remained inside the control limits placed at $\pm 3 \times$ the standard deviation value calculated for the whole set of experiments, for the entire period of time checked. The RSD value obtained ($n = 10$) was 6.0% which demonstrated an excellent stability of the modified magnetic beads–antiprolactin conjugates for at least 34 days provided they were stored in refrigerator at 4°C .

3.3. Cross-reactivity

Prolactin is determined in biological fluids where different hormones may be also found. Therefore, various compounds were tested as potential interferences for the immunosensor response to PRL. These compounds were: progesterone, cortisol, corticosterone, estriol, estradiol and testosterone (Fig. 5) as well as the human growth hormone (hGH). Three different concentration levels of interfering substance were checked: 100, 1000 and 2000 ng mL^{-1} . The DP voltammograms recorded for solutions containing the highest interfering concentration tested as well as the voltammogram for a solution with no PRL are compared with the response obtained for the analyte (Fig. 6). As it can be seen, all the potential interferences exhibited a much smaller peak similar to that obtained for the blank solution. This means that these peaks corresponded to non-specific adsorption of AP-labelled antibodies on the MBs and that none of the species investigated interfered significantly on the immunosensor response. Considering that the non-specific adsorption process produced an error of approximately 10% of the analytical signal, no time consuming blocking steps of the MBs surface after modification with the capture antibody were considered necessary. Moreover, colorimetric ELISA measurements confirmed the absence of significant interference by the compounds checked (results not shown).

3.4. Determination of prolactin in spiked serum samples

The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was evaluated by analyzing human serum samples spiked with PRL at three different concentrations, 10, 100 and 200 ng mL^{-1} . In order to evaluate a possible matrix effect, a calibration graph was constructed by performing appropriate dilutions from the reconstituted serum sample and by applying the procedure described in Section 2. A similar calibration graph to that obtained with PRL standard solutions was found, with a slope value of $7.1 \text{ nA mL ng}^{-1}$ which is practically identical to the value calculated with PRL standards given above ($7.0 \text{ nA mL ng}^{-1}$). Therefore, the determination of PRL in serum samples could be accomplished by interpolation of the peak current value measured for the sample into the calibration plot constructed with PRL standard solutions. The results obtained were 11 ± 2 , 103 ± 8 and $205 \pm 10 \text{ ng mL}^{-1}$ ($n = 4$) for the samples

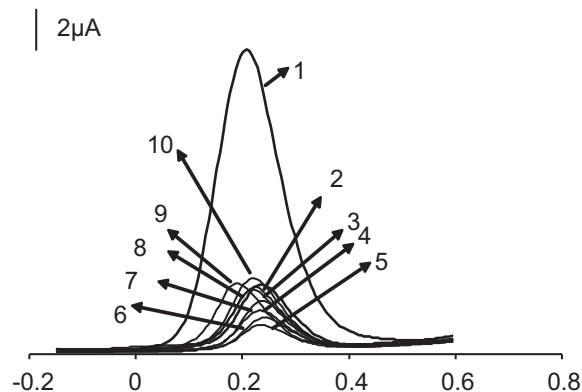


Fig. 6. DP voltammograms recorded for 2000 ng mL^{-1} prolactin (1) and 0 ng mL^{-1} prolactin (2), as well as for 2000 ng mL^{-1} solutions of potential interfering compounds: estradiol (3); hGH (4); testosterone (5); melatonin (6); estradiol (7); cortisol (8); progesterone (9); corticosterone (10).

containing 10, 100 and 200 ng mL⁻¹ PRL, respectively. These results show fairly well the usefulness of the developed immunosensor for the analysis of low prolactin concentrations in human sera with practically no sample treatment.

4. Conclusions

A disposable electrochemical immunosensor for prolactin has been developed for the first time. The immunosensing approach implies coupling of functionalized magnetic beads, a competitive immunoassay, enzyme amplification and differential pulse voltammetry transduction at a screen-printed carbon electrode. This design exhibits an excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, wide range of quantifiable analyte concentrations and inter-assay reproducibility. As a whole, these analytical characteristics represent a remarkable improvement with respect to those reported in the literature using conventional immunoassays. The achieved performance makes the developed magnetosensor a useful and affordable analytical tool for the rapid determination of prolactin in clinical applications, as it has been outlined with the results obtained for the analysis of spiked certified human serum samples.

Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01 and CTQ2009-12650), as well as

of Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642, programme AVANSENS, is gratefully acknowledged.

References

- [1] Y.N. Sinha, *Endocr. Rev.* 16 (1995) 354–369.
- [2] C.R.J. Soares, I.M.C. Camargo, L. Morganti, E. Gimbo, J.E. de Oliveira, R. Legoux, P. Ferrara, P. Bartolini, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 229–236.
- [3] I. Souter, L.M. Baltagi, T.L. Toth, J.C. Petrozza, *Fertil. Steril.* 94 (2010) 1159–1162.
- [4] M. Mondal, C. Rajkhowa, B.S. Prakash, *Anim. Repr. Sci.* 99 (2007) 182–195.
- [5] K.S. Roy, B.S. Prakash, *Theriogenology* 67 (2007) 572–579.
- [6] M. Sarkar, B.S. Prakash, *Theriogenology* 65 (2006) 499–516.
- [7] P.S. Petrou, S.E. Kakabako, I. Christofidis, P. Argitis, K. Misiakos, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 261–268.
- [8] J. Richardson, P. Hawkins, R. Luxton, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 989–993.
- [9] E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret, M.I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2184–2191.
- [10] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta* 605 (2007) 111–129.
- [11] S. Centi, S. Laschi, M. Fránek, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 205–212.
- [12] S. Centi, S. Laschi, M. Mascini, *Talanta* 73 (2007) 394–399.
- [13] Y.Y. Lin, G. Liu, C.M. Wai, Y. Lin, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 1547–1552.
- [14] S. Helali, C. Martelet, A. Abdelghani, M.A. Maaref, N. Jaffrezic-Renault, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5182–5186.
- [15] M. Moreno-Guzmán, M. Eguilaz, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Analyst* 135 (2010) 1926–1933.
- [16] M. Eguilaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 517–522.
- [17] S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 57–63.
- [18] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, 2000, pp. 116–123.

Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles



Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles†‡

María Moreno-Guzmán, Marcos Eguílaz, Susana Campuzano, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño and José M. Pingarrón*

Received 6th April 2010, Accepted 2nd June 2010

DOI: 10.1039/c0an00206b

A novel electrochemical immunosensor using screen-printed carbon electrodes and functionalized magnetic particles was developed for the determination of cortisol. Anti-cortisol antibody was immobilized onto protein A-modified magnetic particles and a direct competitive immunoassay involving cortisol antigen labeled with alkaline phosphatase (AP) was employed. The resulting conjugate was trapped on the surface of the screen-printed electrode with a small magnet. Cortisol quantification was accomplished by using 1-naphthyl phosphate as AP substrate and differential pulse voltammetry for the detection of the formed 1-naphthol. The variables involved in the preparation of the immunosensor and in the electrochemical detection reaction were optimized. The calibration plot obtained for cortisol exhibited a linear range between 5.0×10^{-3} and 150 ng mL^{-1} ($r = 0.993$). The limit of detection was 3.5 pg mL^{-1} , and the EC_{50} was 0.19 ng mL^{-1} . These results demonstrate the high sensitivity achieved with this immunosensor design which compares favourably with other previous reports. The immunosensor also exhibited a high selectivity with respect to other corticosteroid compounds closely related to cortisol. The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was demonstrated by analyzing certified human sera containing cortisol at two different concentration levels.

1. Introduction

Cortisol belongs to the glucocorticoid hormones family and is an important stress bio-marker whose detection is highly relevant in sport medicine.¹ Since 1975, the International Olympic Committee Medical Commission restricted the use of corticoids to legitimate medical purposes. However, the available methods for detecting cortisol show some limitations with respect to their sensitivity, time of analysis and cost. In this context, the use of electrochemical immunosensors, because of their excellent analytical capabilities such as sensitivity, reproducibility, simplicity of construction and use, and feasible miniaturization, can be envisaged as a promising alternative for doping control. These important advantages become more evident insofar as the immunoreagent immobilization and the transduction event are more efficient. Therefore, the preparation of bioelectrodes combining immobilization methods capable of improving stability with no significant loss of the biological activity of biomolecules, with electrochemical transducers able to enhance the electron transfer, constitutes a challenge in modern bio-analytical chemistry.²

Table 1 summarizes the analytical characteristics of some immunosensors reported in the literature for the determination

of cortisol. Few electrochemical approaches have been described. A configuration using aligned gold nanowires as the working electrode with cortisol monoclonal antibody immobilized using the streptavidin/biotin linkage and coupled to a microfluidic device to convert inactive cortisone to active cortisol by means of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase was reported.¹ Also, a reusable amperometric immunosensor was developed for the determination of cortisol by co-immobilizing horseradish peroxidase and cortisol-antibody on a chemically activated affinity membrane mounted over the tip of an oxygen electrode. The enzymatic electrocatalytic current response to the respective substrate is inhibited by the association of the antigen to the co-immobilized antibody.³ An immunoelectrochemical sensor using alkaline phosphatase (AP) was also reported for the determination of salivary cortisol concentration.⁴ In this configuration, microfabricated gold electrodes encased in a microfluidic chamber were functionalized to immobilize the cortisol capture antibodies, the enzyme reaction product, *p*-nitrophenol (pNP), being detected by cyclic voltammetry. An electrochemical immunosensor for real-time determination of corticosteroids was also described.⁵ It was based on the competitive binding of endogenous corticosteroid and a corticosteroid-peroxidase conjugate with antibodies immobilized on a platinum electrode, and the monitoring of peroxidase activity. The electrode was encased within a dialysate membrane which separates the electrode environment from the sampled fluid, allowing measurements to be made *in vivo*. A capillary electrophoretic enzyme immunoassay for cortisol with electrochemical detection was also developed.⁶ In this method, after a competitive enzyme immunoreaction, free HRP-cortisol and bound enzyme-labeled cortisol (HRP-cortisol-anti-cortisol) were separated in the

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: yseo@quim.ucm.es

† This article is part of a web theme in *Analyst*, highlighting analytical science from Spain, France and Italy. Guest editors José M. Pingarrón and Serge Cosnier.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: differential pulse voltammograms performed with different modified electrodes at the EC_{50} value. See DOI: 10.1039/c0an00206b

Table 1 Analytical performance of reported immunosensors for the determination of cortisol

Technique/method	Linear range, ng/mL	Sensitivity	Limit of detection, pg/mL	Precision, RSD %	Sample	Ref.
SWV at a gold nanowire-based electrochemical immunosensor	$(3.6-29) \times 10^3$	0.66 nA/ μ M	—	—	—	1
Amperometric immunosensor based on co-immobilizing HRP and anti-cortisol onto an oxygen electrode	$(0.036-3.6) \times 10^3$	—	—	—	—	3
CV at microfabricated Au electrodes modified with anti-cortisol using AP and pNP. Oxidation peak at 0.9–1.1 V	—	—	—	—	Saliva	4
Immobilization of anti-cortisol onto PtE; competitive binding of cortisol and HRP-cortisol	—	—	2000	—	—	5
Electrophoretic separation of HRP-cortisol and HRP-cortisol-anti-cortisol; enzyme reaction with TMB. Amperometric detection of TMB(Ox) at a carbon fiber microdisk bundle electrode	Up to 60	0.016 nC/ μ g L ⁻¹	616	3.3	—	6
Competitive and non-competitive colorimetric ELISA using cortisol-poly(L-Lys) conjugates and HRP-cortisol	—	—	150 (non-competitive) 720 (competitive)	—	—	7
Non-competitive colorimetric ELISA using cortisol-poly(L-Lys) conjugates and HRP-cortisol	—	—	72 (standard solutions) 509 (saliva)	—	Spiked saliva Mean recoveries: 80–120%	8
Competitive colorimetric ELISA using cortisol-3-O-carboxyl-methyloxime-BSA (F-3-CMO-BSA) and corticosterone-3-carboxymethyl oxime biotin conjugate (B-3-CMO)	—	—	900	3.3–7.8 (intra-assay) 2.3–7.7 (inter-assay)	Spiked serum Mean recoveries: 90.3–104.2%	9
SPR by immobilization of anti-cortisol onto 11-mercaptopentadecanoic acid (MUA) SAM by covalent bond using EDC-NHS	5–154	0.54 m ² L μ g ⁻¹ (urine) 0.46 m ² L μ g ⁻¹ (saliva)	2000	8.9 (urine); 9.3 (saliva)	Urine, saliva	10
DPV immunosensor based on screen-printed electrodes and functionalized MBs. Oxidation peak at –0.15–0.25 V	$5 \times 10^{-3} - 150$	0.34	3.5	5.7 (intra-assay) 8.4 (inter-assay)	Certified serum	This work

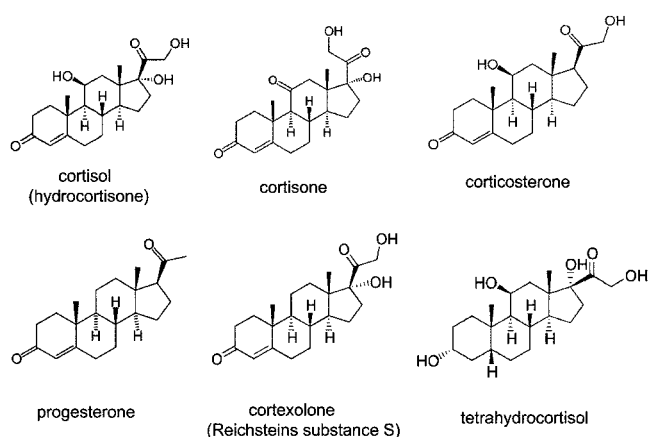
separation capillary and then catalyzed the enzyme substrate [tetramethylbenzidine, TMB(Red)] in the reaction capillary. The product of the enzymatic catalysis reaction [TMB(Ox)] was amperometrically detected on a carbon fiber microdisk bundle electrode. Colorimetric immunoassays for cortisol were also described and applied to the analysis of saliva.^{7,8} The methods consisted of the formation of a cortisol-Ab complex followed by the blocking of free antibody sites by a cortisol-poly-L-lysine. Cortisol-3-*O*-carboxymethyloxime-BSA (F-3-CMO-BSA) and corticosterone-3-carboxymethyl oxime biotin conjugate (B-3-CMO) were also used for the preparation of a competitive immunoassay applied to serum samples.⁹ SPR by immobilization of anti-cortisol onto an 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) SAM by covalent bond using EDC-NHS was also used.¹⁰

In this work, we describe a novel electrochemical immuno-sensor configuration for the quantification of cortisol using screen-printed carbon electrodes and functionalized magnetic beads. This kind of microparticle constitutes nowadays a powerful and versatile tool for the development of immuno-sensing platforms.¹¹ They respond to an applied magnetic field and have a large active surface area which makes possible the immobilization of a high concentration of biomolecules onto the solid phase of the transducer, as well as a decrease of matrix effects.¹² This methodology has been applied to the immuno-sensing of various compounds in food analysis,¹³ antibiotics,¹² polychlorinated biphenyls (PCBs),^{14,15} polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs),¹⁶ and atrazine.¹⁷ In our developed configuration, anti-cortisol antibody was immobilized onto protein A-modified magnetic particles, and a competitive immunoassay involving cortisol antigen labeled with alkaline phosphatase (AP) was performed. The resulting conjugate was trapped on the surface of the screen-printed electrode with a small magnet. This strategy allows the measurements to be carried out with small solution volumes giving rise to a high concentration of reagents on the transducer surface and, therefore, enabling the achievement of low detection limits. Cortisol determination was accomplished by differential pulse voltammetry of 1-naphthol formed upon 1-naphthyl phosphate additions. The packing of the magnetic beads on the surface of the electrode also implies that the product of the enzyme reaction is generated very close to the electrode surface, thus allowing the steady-state to be reached rapidly (which implies faster measurements), and minimizing diffusion limitations of the electroactive species.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Murine monoclonal anti-cortisol (2.39 mg mL⁻¹) was purchased from East Coast Bio, ME, USA. Cortisol labeled with alkaline phosphatase in position 3 (1 mg/mL), with an enzyme activity of 1840 U/mg, was obtained from Cal Bioreagents, CA, USA. Unlabeled cortisol (Aldrich >98%) and 1-naphthyl phosphate monosodium salt monohydrate (Sigma) were also used. Diluted solutions of anti-cortisol were prepared in B&W 0.1 M phosphate (Scharlab, 99%) and 0.01% Tween® 20 (Aldrich) buffer solution of pH 8.2. A 50 mM Tris (Scharlau, 99%) and 20 mM NaCl (Scharlau, 99%) buffer solution of pH 7.2, and a 0.1 M



Scheme 1 Chemical structures of cortisol and related compounds.

Trizma base (Sigma, 99%) and 1 mM magnesium chloride (Panreac, 99%) buffer solution of pH 9.0, were also employed. A 5 mg/mL stock methanolic solution of unlabeled cortisol was prepared and, from this, 1000 ng/mL solutions of unlabeled cortisol in Tris buffer solution of pH 7.2 were prepared. 1000 ng/mL stock AP-labeled cortisol solutions were prepared daily in the same buffer. More diluted solutions of AP-labeled and unlabeled cortisol were prepared daily by dilution with Tris buffer solution of pH 7.2. 0.05 M solutions of 1-naphthyl phosphate were also prepared daily in Trizma base buffer of pH 9.0. 5 mg/mL stock methanolic solutions of cortisone, corticosterone, progesterone, cortexolone (Reichsteins substance S) and tetrahydrocortisol were prepared (see Scheme 1 for chemical structures). From these, a 1000 ng/mL stock and more diluted solutions were prepared in Tris buffer solution of pH 7.2. Magnetic beads (MBs) functionalized with protein A (Dyna-beads® Protein A) were from Dynal Biotech ASA (Oslo, Norway). Before use, MB suspensions were homogenized and, for each time, 1 µL was transferred to an eppendorf tube and washed twice with 100 µL B&W buffer solution of pH 8.2.

2.2. Samples

Two certified samples of lyophilised human serum with no additives, ERM-DA 192 and ERM-DA 193 (European Reference Materials) (Sigma), containing 98.8 and 277 ng mL⁻¹ cortisol in the reconstituted serum, respectively, were analyzed.

2.3. Apparatus and electrodes

All electrochemical measurements were carried out using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.). Screen-printed carbon electrodes (4 mm diameter) were purchased from DropSens (Oviedo, Spain) and used as the working electrodes. These electrodes include a silver pseudo-reference electrode and a carbon counter electrode. All experiments were performed at room temperature.

A P-Selecta ultrasonic bath, an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A.), and a P-Selecta

Agimatic magnetic stirrer, all distributed by Scharlab, Madrid, Spain, were also used. A neodymium magnet (AIMAN GZ, Madrid, Spain) was used to control the attraction of magnetic beads to the SPCE surface. The magnetic separation during washing steps was performed with a magnetic separator Dynal MPC-S (product no. 120.20, Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway).

2.4. Immunoassay procedure

1 μL of the functionalized MBs suspension was transferred to an eppendorf tube and re-suspended in 50 μL of a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-cortisol solution prepared in Tris buffer of pH 7.2. After 30 min incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ under stirring, the tube was placed on the magnet holding block for 2 min. Once MBs were deposited on the bottom of the test tube, the supernatant was removed and the beads bearing the antibodies were washed twice with 100 μL of B&W buffer solution of pH 8.2 and, once more, with Tris buffer of pH 7.2. Each washing step consisted of a re-suspension of the beads in the washing solution and gentle stirring for 1 min (up to homogenization) followed by separation with the magnet for 2 min to remove the solution. Then, in order to perform the competitive assay, anti-cortisol-protein A-MBs were re-suspended in 100 μL of an appropriate cortisol/AP-labeled cortisol mixture solution. After 45 min incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ under stirring, the tube was placed on the magnet holding block for 2 min. Then, the supernatant was removed, and two washing steps with two 100 μL portions of Tris buffer solution of pH 7.2 were carried out. Subsequently, the AP-cortisol/cortisol-anti-cortisol-protein A-MBs were re-suspended in 45 μL of Trizma buffer of pH 9.0 and transferred onto the surface of the SPCE. This was made keeping the SPCE horizontal and placing a neodymium magnet on the bottom part of the electrode to localize in a reproducible way the MBs onto the working surface, thus avoiding variations

in bead layer thickness or spreading area on the electrode surface between different measurements. Then, 5 μL of 0.05 M 1-naphthyl phosphate solution were deposited on the electrode and allowed to stand for 8 min. Differential pulse voltammograms were recorded over the -0.15 to $+0.60$ V potential range. Each experimental point in all the studies was carried out with a new prepared sensor.

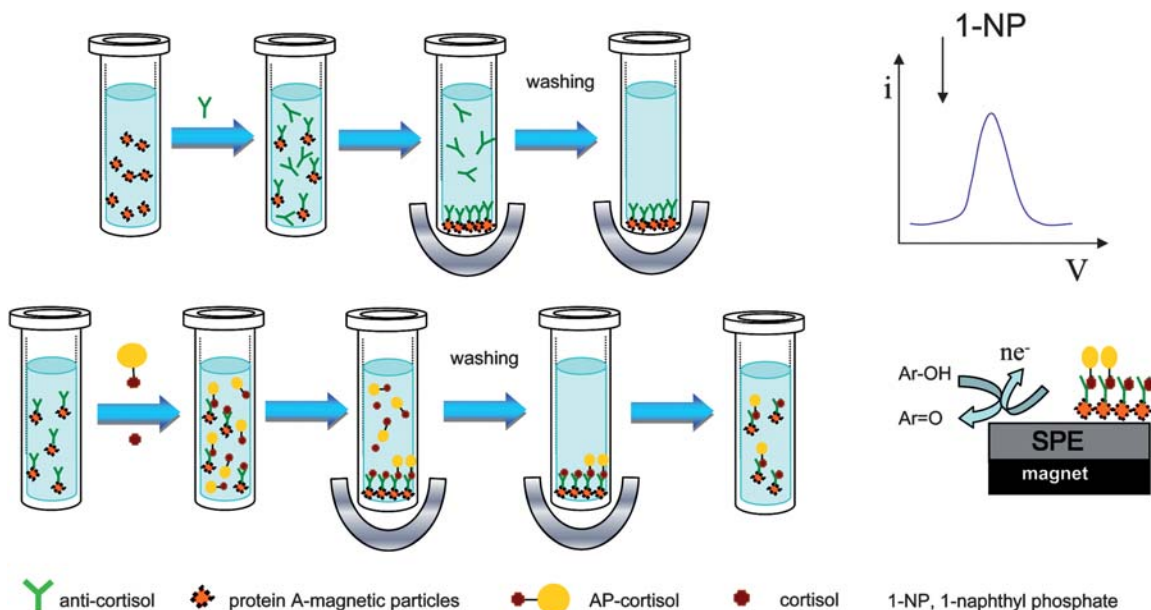
2.5. Sample analysis

Glass ampoules containing lyophilized serum samples were stored at -40 $^{\circ}\text{C}$. When used, the solid from each ampoule was reconstituted in 1.25 mL of distilled water at 20 $^{\circ}\text{C}$ by gentle stirring and mixing up to total dissolution. Cortisol determination was performed by applying the procedure described above, and the i_p values obtained by DPV from serum samples were interpolated into the linear portion of the calibration plot obtained with cortisol standard solutions.

3. Results and discussion

The immunoassay procedure is schematically displayed in Scheme 2. Anti-cortisol antibodies were immobilized onto protein A-magnetic beads (MBs). A competitive assay between cortisol and the antigen labeled with alkaline phosphatase (AP) for the binding sites of the immobilized antibodies was employed. The addition of the AP substrate 1-naphthyl phosphate produced 1-naphthol as the AP enzyme reaction product, and its voltammetric oxidation at the SPCE was used to monitor the affinity reaction. After each incubation or washing steps, MBs were separated from the solution by means of a small neodymium magnet.

Firstly, the electrochemical detection of different phenolic compounds (phenol, *p*-nitrophenol and 1-naphthol) that can be generated as AP hydrolysis products from their respective



Scheme 2 Schematic display of procedures involved in the determination of cortisol with the disposable immunosensor using functionalized magnetic beads.

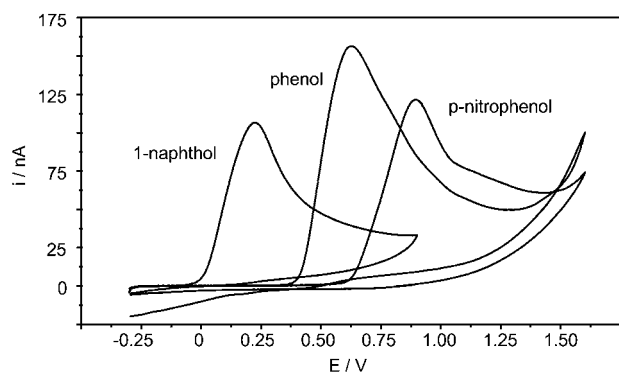


Fig. 1 Cyclic voltammograms from 5.0 mM 1-naphthol, phenol, and *p*-nitrophenol at a screen-printed carbon electrode (SPCE). Supporting electrolyte, 0.1 M Trizma and 1 mM MgCl₂ buffer solution of pH 9.0; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

phosphate derivatives used as enzyme substrates, was evaluated at the SPCE. Cyclic voltammograms from 5.0 mM solutions of these phenolics in Trizma buffer of pH 9.0 (Fig. 1) showed that the 1-naphthol irreversible oxidation occurred at a remarkably less positive potential and gave rise to a slightly lower peak current than that observed for the other compounds. Accordingly, and as a compromise between sensitivity and selectivity, 1-naphthyl phosphate was selected as the enzyme substrate for further work.

3.1. Optimization of the experimental variables involved in the immunosensor response to cortisol

The influence of 1-naphthyl phosphate concentration on the differential pulse voltammetric responses recorded in the -0.15 to 0.60 V potential range at SPCE immunosensors prepared, as described in the Fig. 2 caption, was checked. Such a figure shows that the current increased with the substrate concentration between 5.0×10^{-5} and approximately 10^{-2} M , before levelling off. Accordingly, a 0.05 M 1-naphthyl phosphate concentration was selected to ensure that the enzyme reaction rate depended only on the enzyme concentration.

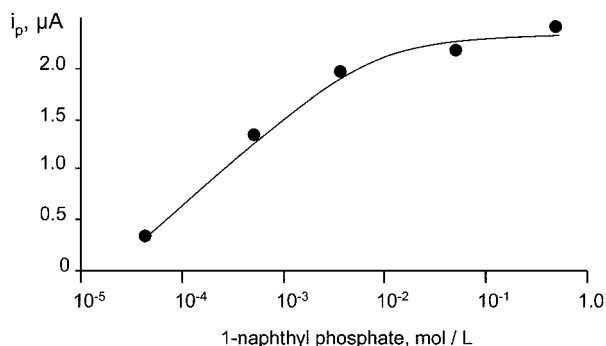


Fig. 2 Effect of the 1-naphthyl phosphate concentration on the DPV peak current measured at SPCEs modified with $30 \mu\text{g}$ MBs, $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-cortisol and 50 ng mL^{-1} cortisol-AP. $\Delta E = 70 \text{ mV}$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Supporting electrolyte, 0.1 M Trizma and 1 mM MgCl₂ buffer solution of pH 9.0.

Furthermore, the enzyme reaction with 1-naphthyl phosphate was performed at pH 9.0, which corresponded to the optimum alkaline phosphatase activity.¹⁸ Also, the time that this hydrolysis reaction was allowed to proceed was optimized. Considering both a high sensitivity and a short time for analysis as the selection criteria, the time for 1-naphthyl phosphate hydrolysis was fixed to 8 min.

Moreover, the variables concerning the preparation of the immunosensor were optimized. The influence of the amount of magnetic beads immobilized on the electrode surface on the DP voltammetric signal was evaluated in the range between 15 and $300 \mu\text{g}$ (0.5 – $10 \mu\text{L}$ of MBs suspension) in the presence of an excess of both anti-cortisol ($23.90 \mu\text{g mL}^{-1}$) and AP-labeled cortisol (1000 ng mL^{-1}). Fig. 3a shows an increase in the peak current with the MB loading up to $60 \mu\text{g}$. Larger immobilized amounts produced a peak current decrease, probably due to a higher electron transfer resistance for large modified-MB loadings. Furthermore, Fig. 3b shows the effect of the MB loading on the immunosensor response for cortisol concentrations between 10^{-6} and 10^2 ng mL^{-1} . As can be seen, the higher peak current values were obtained for lower MB loadings, this effect being more significant for the lowest cortisol concentrations tested. These results suggested that a wider signal range and a higher calibration slope value would be obtained when working

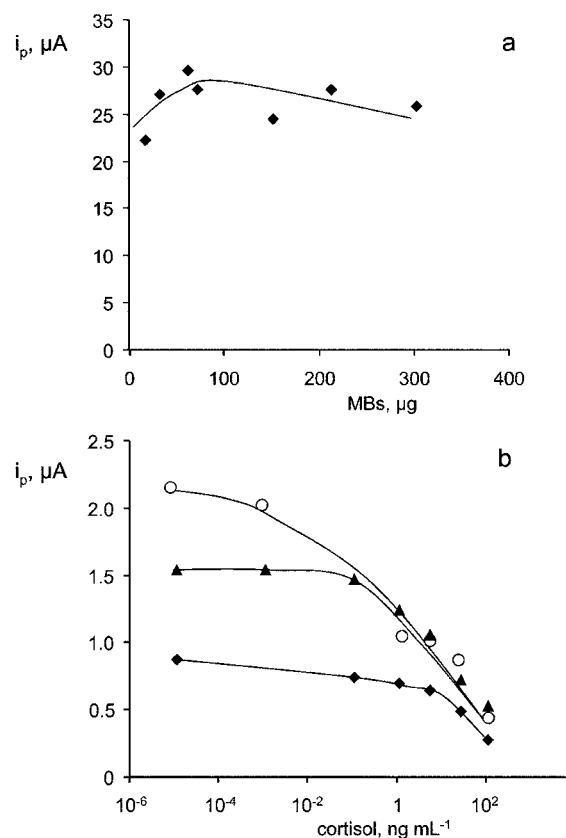


Fig. 3 Effect of MB loading on the SPCE on the peak current obtained by DPV for immunoassays performed in the presence of $23.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-cortisol and 1000 ng mL^{-1} cortisol-AP in the absence of cortisol (a), and in the presence of cortisol in the 10^{-6} – $10^{-2} \text{ ng mL}^{-1}$ range using $1 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{g}$) MBs (\circ); $2 \mu\text{L}$ ($60 \mu\text{g}$) MBs (\blacktriangle), and $10 \mu\text{L}$ ($300 \mu\text{g}$) MBs (\blacklozenge). Other variables as in Fig. 2.

with low MB loadings. Therefore, 30 μg (1 μL) MBs was selected as the MB loading value for further work.

The amount of antibody immobilized onto the magnetic beads plays, of course, a key role in the linear range and sensitivity of competitive immunoassays. This variable was evaluated immobilizing 50 μL of different anti-cortisol solutions prepared in the 0–23.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range. An excess of labeled cortisol (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was employed in these tests. As expected, the DPV i_p value increased rapidly with the Ab concentrations for low anti-cortisol concentrations (Fig. 4a). The i_p value tended to level off for larger antibody loadings indicating saturation of the protein A-MB binding sites. The time of incubation of anti-cortisol with protein A-MBs was also optimized (Fig. 4b). The peak current increased for the first 10 min and then levelled off up to 1 h, the longest time tested. According to these optimization studies, a 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-cortisol concentration and an incubation time of 30 min were selected for further work.

The cortisol-AP conjugate concentration was optimized by testing the electrochemical response of various immunosensors prepared with cortisol-AP in the 0–100 ng mL^{-1} range. The obtained results (not shown) revealed a high increase of i_p values for the lower cortisol-AP concentrations checked and a stabilization from 50 ng mL^{-1} , indicating saturation of the antibody binding sites. Using this conjugate concentration, incubation for 45 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ was shown to be appropriate to allow an adequate competition between cortisol and cortisol-AP for the binding positions of anti-cortisol.

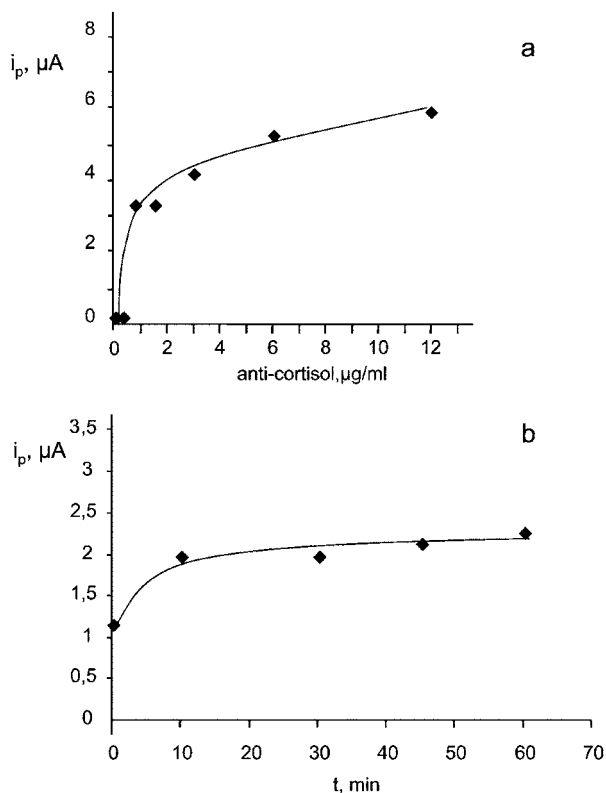


Fig. 4 Effect of the amount of anti-cortisol immobilized (a), and the incubation time of 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-cortisol (b), on the current response at SPCEs modified with 1 μL (30 μg) MBs, in the absence of cortisol and in the presence of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cortisol-AP. Other variables as in Fig. 2.

3.2. Analytical characteristics for cortisol determination

Fig. 5 shows the calibration plot for cortisol obtained by differential pulse voltammetry under the optimized conditions stated above. Error bars are calculated for measurements carried out with three different modified electrodes, except for the assays performed with no cortisol and the EC_{50} value where eight measurements were made (see below). The calculated errors were below 10% for all the points displayed. As it was obvious for a competitive assay, i_p decreased with increasing cortisol concentration. The concentration tested ranged between 10^{-6} and 10^4 ng mL^{-1} cortisol. The i_p vs. cortisol concentration curve was fitted by non-linear regression using the Sigma Plot data analysis software. The adjusted equation ($r = 0.998$) was:

$$i_p = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + \text{EC}_{50}/x} + i_{\min}$$

where i_{\max} and i_{\min} were the maximum and minimum current values of the calibration graph: 2.22 ± 0.04 μA and 0.31 ± 0.04 μA , respectively. The EC_{50} value, which is the cortisol concentration corresponding to a fifty per cent competition, was 0.19 ± 0.05 ng mL^{-1} , and the Hill slope, h , was -0.34 ± 0.03 . The observed range of linearity ranged between 5.0×10^{-3} and 150 ng mL^{-1} ($r = 0.993$). This wide range of concentrations (more than four orders of magnitude) is in agreement with the low h value.¹⁹

The limit of detection was calculated from the equation:²⁰

$$\text{LOD} = \text{EC}_{50} \left(\frac{i_{\max} - i_{\min}}{i_{\max} - i_{\min} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

where s is the standard deviation ($n = 10$) of the zero value (the i_p value measured in the absence of cortisol). This mean i_p value $\pm s$ was 2.26 ± 0.13 μA , with a relative standard deviation of 5.7%. Accordingly, a LOD value of 3.5 pg mL^{-1} cortisol was calculated. This value is much lower than the limits of detection for cortisol reported in the previous literature. Comparing with the methods summarized in Table 1, it can be deduced that this LOD is more than twenty-fold lower than the smallest reported value (72 pg mL^{-1}).

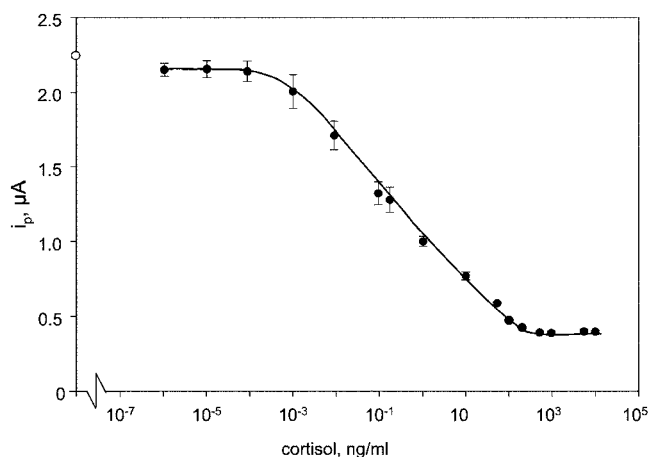


Fig. 5 Calibration plot for cortisol obtained with the cortisol-AP-anti-cortisol-protein A-MB-SPCE immunosensor by differential pulse voltammetry; (○) i_p value obtained for no cortisol addition.

The reproducibility of the voltammetric measurements was evaluated by carrying out repetitive assays both for no cortisol added and for a 0.2 ng mL^{-1} (the EC_{50} value) cortisol concentration on the same day and on different days. Relative standard deviation (RSD) values of 5.7 and 5.8% ($n = 8$) were obtained, respectively, for the assays performed on the same day, whereas the RSD values ($n = 8$) were 7.4% without addition of the analyte and 8.4% for 0.2 ng mL^{-1} cortisol when the measurements were carried out on different days.

Also, the stability of the modified magnetic beads-anti-cortisol conjugates was tested. In order to do that, different eppendorf tubes containing the same amount of conjugate were prepared on the same day and stored in a refrigerator at 4°C . Then, each prepared conjugate was used to measure the analytical signal obtained when no cortisol was added during a period of time of 30 days. The RSD value obtained ($n = 10$) was 8.5%, indicating that the modified magnetic beads-anti-cortisol conjugates remained stable for at least one month provided that they were stored in a refrigerator at 4°C . This methodology using the confinement of magnetic particles on the electrode surface also offers relevant advantages on ELISA methods involving non-electrochemical transduction. Apart from the much lower detection limit achieved (see Table 1) commented upon above, the proposed methodology reduces considerably the consumption of immunoreagents and the amount of sample required for the analysis. In fact, both incubation and detection steps can be made with low solution volumes.

3.3. Cross-reactivity

Various compounds closely related with cortisol were tested as interferents using the developed immunosensor. As can be deduced from Scheme 1, the investigated species, cortisone, corticosterone, progesterone, cortexolone (Reichsteins substance S) and tetrahydrocortisol, are corticosteroids with a structure similar to that of cortisol.²¹ The cross-reactivity was calculated from the EC_{50} value for each tested compound. The results are displayed in Table 2. As can be observed, all the species gave very low % CR, with values lower than 0.01%. This is an important feature of the developed immunosensor, whose high selectivity is provided by the specificity of the antibody to react with cortisol and not, or in a much lower extent, with structurally related compounds. Obviously, the cross-reactivity values of cortexolone and corticosterone are higher, because these molecules differ only in the presence of a hydroxy group in position 11 or 17, respectively, with that of cortisol.

Table 2 Cross-reactivity for anti-cortisol and some cortisol related compounds

Compound	EC_{50} , ng mL^{-1}	% CR ^a
Cortisol	0.19 ± 0.05	100
Cortexolone	$(0.6 \pm 0.9) \times 10^3$	0.03
Corticosterone	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^4$	1.9×10^{-3}
Cortisone	$(2.7 \pm 0.3) \times 10^4$	7.0×10^{-4}
Hydrocortisol	$(6 \pm 1) \times 10^5$	3.2×10^{-5}
Progesterone	$>10^7$	$<2 \times 10^{-6}$

^a % CR = $100(\text{EC}_{50})_{\text{cortisol}}/(\text{EC}_{50})_{\text{interferent}}$.

3.4. Determination of cortisol in certified serum samples

The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was demonstrated by analyzing human serum samples containing cortisol at two different certified concentrations, 277 and 98.8 ng mL^{-1} . Calibration graphs from serum samples were constructed by performing appropriate dilution from the reconstituted sera and applying the procedure described in the Experimental section for cortisol standard solutions. Errors bars were calculated in all cases for three different measurements. As can be observed in Fig. 6, similar curves to that corresponded to cortisol standard solutions were obtained for both certified sera. The Hill slope values for these calibration graphs were -0.37 ± 0.05 and -0.29 ± 0.07 for ERM-DA192 and ERM-DA193, respectively. These values match fairly well with that of cortisol standard solutions (-0.34 ± 0.03). Therefore, the determination of cortisol in serum samples was accomplished by interpolation of the i_p values into the calibration plot obtained with cortisol standard solutions. Various samples prepared by dilution of sera containing cortisol concentrations in the linear range of the calibration graph were tested. The results are summarized in Table 3, showing that the analysis of cortisol was feasible in a wide range of analytical concentrations. These results show

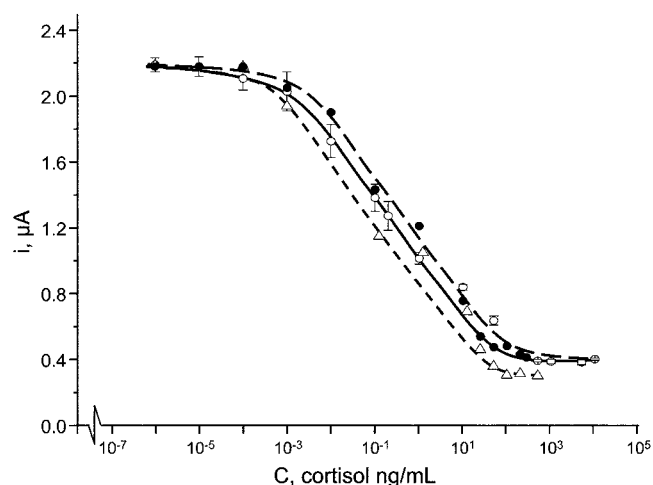


Fig. 6 Calibration plots obtained by DPV with cortisol-AP-anti-cortisol-protein A-MB-SPCE immunosensors for cortisol standard solutions (\circ), and ERM-DA192 (\triangle) and ERM-DA193 (\bullet) certified serum samples.

Table 3 Determination of cortisol in certified human serum

Sample	Cortisol, ng/mL	Cortisol found, ng/mL
ERM-DA192		
d1	0.001	0.0012 ± 0.0006
d2	0.100	0.10 ± 0.01
d3	10.0	12 ± 2
d4	100	104 ± 2
ERM-DA193		
d1	0.001	0.0013 ± 0.0005
d2	0.120	0.116 ± 0.005
d3	1.24	1.4 ± 0.2
d4	12.4	12 ± 2

fairly well the usefulness of the developed immunosensor for the analysis of low cortisol concentrations in human sera with practically no sample treatment.

Conclusions

The disposable immunosensor for cortisol developed by coupling functionalized magnetic beads, a competitive immunoassay, enzyme amplification and differential pulse voltammetry transduction at a screen-printed carbon electrode exhibits a high analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, wide range of quantifiable analyte concentrations, precision and inter-assay reproducibility. This performance can be advantageously compared with that reported for other previous immunosensor designs, and makes this magnetoimmunosensor a useful and affordable analytical tool for the rapid determination of cortisol in sport medicine and other clinical applications, as it has been demonstrated in the analysis of certified human serum samples.

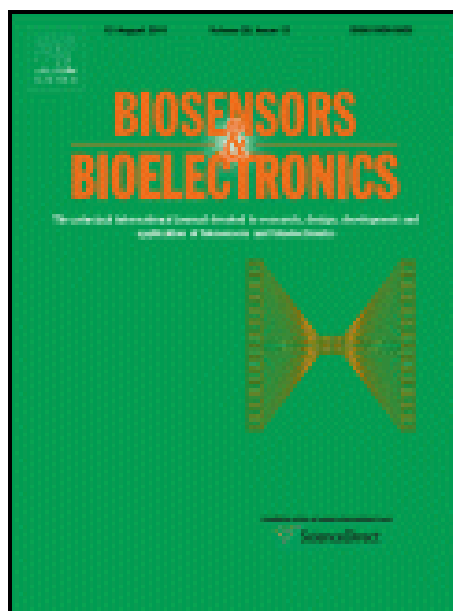
Acknowledgements

Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01 and CTQ2009-12650), as well as of Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642, programme AVANSENS, is gratefully acknowledged.

References

- 1 A. Kumar, S. Aravamudhan, M. Gordic, S. Bhansali and S. S. Mohapatra, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 2138–2144.
- 2 V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **596**, 86–91.
- 3 Y. H. Xu and A. A. Suleiman, *Anal. Lett.*, 1997, **30**, 2675–2689.
- 4 K. Sun, N. Ramgir and S. Bahnsali, *Sens. Actuators*, 2008, **33**, 533–537.
- 5 C. J. Cook, *Nat. Biotechnol.*, 1997, **15**, 467–471.
- 6 M. Jia, Z. He and W. Jin, *J. Chromatogr., A*, 2002, **966**, 187–194.
- 7 G. Giraudi, L. Anfossi, I. Rosso, C. Baggiani, C. Giovannoli and C. Tozzi, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4697–4700.
- 8 L. Anfossi, C. Tozzi, C. Giovannoli, C. Baggiani and G. Giraudi, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **468**, 315–321.
- 9 S. Nara and V. Tripathi, *Talanta*, 2008, **77**, 210–216.
- 10 M. Frascioni, M. Mazzarino, F. Botrè and F. Mazzei, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 2151–2159.
- 11 J. Richardson, P. Hawkins and R. Luxton, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, **16**, 989–993.
- 12 E. Zacco, J. Adrian, R. Galve, M.-P. Marco, S. Alegret and M. I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 2184–2191.
- 13 F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli and G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **605**, 111–129.
- 14 S. Centi, S. Laschi, M. Fránek and M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **538**, 205–212.
- 15 S. Centi, S. Laschi and M. Mascini, *Talanta*, 2007, **73**, 394–399.
- 16 Y. Y. Lin, G. Liu, C. M. Wai and Y. Lin, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 1547–1552.
- 17 S. Helali, C. Martelet, A. Abdelghani, M. A. Maaref and N. Jaffrezic-Renault, *Electrochim. Acta*, 2006, **51**, 5182–5186.
- 18 S. Ito, S. Yamazaki, K. Kano and T. Ikeda, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **424**, 57–63.
- 19 P. Tijssen, Practice and theory of enzyme immunoassays, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. R. H. Burdon and P. H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam, 1985, vol. 15, p. 414.
- 20 G. Conneely, M. Aherne, H. Lu and G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **583**, 153–160.
- 21 H. Lu, M. P. Kreuzer, K. Takkinen and G. G. Guilbault, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1756–1763.

Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors





Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors

María Moreno-Guzmán, Irene Ojeda, Reynaldo Villalonga, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño*, José M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2011

Received in revised form 16 January 2012

Accepted 10 February 2012

Available online 17 February 2012

Keywords:

Adrenocorticotropin hormone

Phenyl boronic acid

Electrochemical immunosensor

ABSTRACT

This work reports for the first time an electrochemical immunosensor for the determination of adrenocorticotropin hormone (ACTH). The immunoelectrode design involves the use of amino phenylboronic acid for the oriented immobilization of anti-ACTH antibodies onto screen-printed carbon modified electrode surfaces. A competitive immunoassay between the antigen and the biotinylated hormone for the binding sites of the immobilized antibody was performed. The electroanalytical response was generated by using alkaline phosphatase-labelled streptavidin and 1-naphtyl phosphate as the enzyme substrate. The electrochemical oxidation of the enzyme reaction product, 1-naphtol, measured by differential pulse voltammetry was employed to monitor the affinity reaction. Under the optimized working conditions, an extremely low detection limit of 18 pg/L was obtained. Cross-reactivity was evaluated against other hormones (cortisol, estradiol, testosterone, progesterone, hGH and prolactin) and the obtained results demonstrated an excellent selectivity. The developed immunosensor was applied to a human serum sample containing a certified amount of ACTH with good results.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human adrenocorticotropin hormone (ACTH) is a peptide with 39 amino acids, 4500 Da, obtained by enzymatic cleavage of a precursor, the pro-opiomelanocortin (POMC) synthesized in the anterior pituitary (Yalow and Berson, 1971; Guillemin et al., 1977). The main function of the hormone is the induction of the synthesis of corticoids, especially cortisol. Levels of ACTH in serum fluctuate between <4.1 and 51.4 ng/L (Talbot et al., 2003) with the higher levels in the early morning and the lower levels in the evening (Norton et al., 2001). Several factors such as stress, pain, trauma, hypoxia, hypothermia and hypoglycemia can increase the concentration of ACTH in serum. The determination of ACTH levels in plasma is a key step in the diagnosis of pituitary Cushing's syndrome, adrenocortical insufficiency (Addison's disease), hypopituitarism, and pituitary tumors (Talbot et al., 2003). Furthermore, the administration of ACTH is banned by the World Antidoping Agency (WADA) because it stimulates corticosteroid production and generates euphoria (Thevis et al., 2006). Various immunoassays have been proposed in the literature for the determination of ACTH using different antibodies and radioactivity, chemiluminescence or fluorescence as detection techniques. These methods were claimed

to be suitable to cover ranges between a few units up to various hundreds of ng/L ACTH (Talbot et al., 2003; Brossaud et al., 2011; Vogeser et al., 2000; Dobson et al., 1987). However, to our knowledge, no immunosensors for the determination of ACTH are described at present in the literature.

In particular, electrochemical immunosensors have demonstrated to gather useful analytical characteristics such high sensitivity, rapid response and easiness of use (Fowler et al., 2008). A crucial aspect in the design of these bioelectrodes is the combination of immobilization methods able to improve the immunoreagent stability and favourable orientation with a high electroanalytical performance. In this sense, various approaches have been described in the literature including the use of nanostructured electrode surfaces (Carralero et al., 2007; Wang, 2007; Pingarrón et al., 2008), self-assembled monolayers (Arya et al., 2009; Hao et al., 2007), or magnetic particles (Centi et al., 2007; Tang et al., 2010; Eguílaz et al., 2010). Another strategy that has demonstrated its usefulness for this purpose is the use of boronic acids which interact with sugars to form cyclic boronate esters at room temperature (Abad et al., 2002). This kind of binding reaction can be also successfully employed for the orientation of antibody molecules onto an electrode surface (Ho et al., 2011).

In this paper, we report the construction of an electrochemical immunosensor enabling the ultrasensitive determination of ACTH. The immunosensor design involves the combination of phenylboronic acid-modified screen-printed carbon electrodes,

* Corresponding author. Fax: +34 913944329.

E-mail address: yseo@quim.ucm.es (P. Yáñez-Sedeño).

to efficiently immobilize ACTH antibodies, with a competitive immunoassay involving biotinylated ACTH, and a differential pulse voltammetric detection step using alkaline phosphatase-labelled streptavidin and 1-naphthyl phosphate (1-NPP) as enzyme substrate.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

A 1.05 mg/mL stock solution of anti-ACTH C-terminal (Fitzgerald, MA, USA) was prepared by suitable dilution with 0.05 M phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS). Biotinylated ACTH (Biotin-ACTH) was obtained from AnaSpec, CA, USA, and 1.0 mg/mL solutions were prepared by dilution with distilled water. More diluted solutions were prepared by dilution with PBS. A stock 1.0 mg/mL alkaline phosphatase-labelled streptavidin (Strept-AP) (Sigma) solution was prepared in Tris-HCl buffer of pH 7.2, and more diluted solutions were prepared in the same buffer. A stock 1.0 mg/mL solution of ACTH from Genway Biotech, CA, USA was prepared in water and stored at -40°C until use. More diluted solutions were prepared by dilution with PBS. 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Type H2, Gerbu) solutions were prepared in PBS. A Trizma base (Sigma, 99%) and 1 mM magnesium chloride (Panreac, 99%) buffer solution of pH 9.0 (Trizma buffer), was also employed. 0.05 M solutions of 1-NPP (Fluka) were prepared by dilution with Trizma buffer. 4-Aminobenzoic acid (ABA, Across), 3-aminophenylboronic acid (APBA, Sigma), 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma), were also used. For the cross-reactivity assays, cortisol, testosterone, β -estradiol, progesterone, human growth hormone (hGH), all from Sigma, and prolactin (Immunometrics, UK), were tested.

All chemicals were of analytical-reagent grade and the water used was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, NA, USA).

2.2. Samples

A certified sample of lyophilized human serum from NIBSC, 74/555, where each ampoule contained the freeze-dried residue of 0.5 mL of a solution which contained 25 μg ACTH was analyzed. The solid was reconstituted in distilled water for a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ACTH.

2.3. Apparatus and electrodes

All electrochemical measurements were carried out using a PGSTAT 12 potentiostat from Autolab. The electrochemical software was the general-purpose electrochemical system (GPES) (EcoChemie B.V.). Screen-printed carbon electrodes (4 mm diameter) were purchased from DropSens (Oviedo, Spain) and used as the working electrodes. These electrodes include a silver pseudo-reference electrode and a carbon counter electrode. All experiments were performed at room temperature. A P-Selecta ultrasonic bath, an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A.), and a P-Selecta Agimatic magnetic stirrer, all distributed by Scharlab, Madrid, Spain, were also used.

2.4. Procedures

2.4.1. Preparation of aminophenylboronic acid-modified screen-printed carbon electrodes (APBA-SPCEs)

Screen-printed carbon electrodes were modified with aminophenylboronic acid by means of a two step procedure.

Firstly, 20 mg of ABA were dissolved in 2 mL of 1 M HCl and cooled with ice. Then, the diazonium salt was prepared by adding 2 mM NaNO_2 aqueous solution dropwise to this solution (38 μL for each 200 μL) with constant stirring. Next, 40 μL from the resulting solution was placed onto the SPCE and ten successive voltammetric cycles ranging between 0.0 and -1.0 V ($\nu = 200\text{ mV/s}$) were carried out. The modified electrodes were washed thoroughly with water and methanol and dried at room temperature. In a second step, 10 μL from an EDC/NHS (0.1 M each) aqueous solution were placed onto the modified electrode and left to react for 1 h. After rinsing with water and methanol and drying, 10 μL from a 50 mM APBA were placed onto the electrode. After 3 h, the resulting aminophenylboronic electrode (APBA/SPCE) was rinsed with water and methanol, and dried.

2.4.2. Preparation of the ACTH immunosensor

10 μL of a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-ACTH solution in PBS were dropped onto the APBA/SPCE and left to stand overnight. Then, 10 μL of a 2% BSA blocking solution were deposited onto the anti-ACTH/APBA/SPCE and left to incubate for 1 h. In order to perform the competitive assay, 10 μL of a mixture of the appropriate standard ACTH solution (or the sample) and 750 ng/mL Biotin-ACTH were placed onto the electrode surface and incubated for 45 min at 8°C . Subsequently, 10 μL of 2000 ng/mL Strept-AP was added and, after 60 min, 45 μL of Trizma buffer plus 5 μL of 0.05 M 1-NPP solution were deposited onto the electrode and allowed to stand for 8 min. Differential pulse voltammograms were recorded over the -0.15 to $+0.60\text{ V}$ potential range.

2.4.3. Sample analysis

Glass ampoules containing lyophilized serum samples were stored at -40°C . When used, the solid from each ampoule was reconstituted in 2.5 mL distilled water at 20°C by gentle stirring and mixing up to total dissolution. ACTH determination was performed by applying the procedure described above, and the peak current values measured by DPV were interpolated into the linear portion of the calibration plot obtained with ACTH standard solutions.

3. Results and discussion

The fundamentals of the developed immunosensor are illustrated in Fig. 1. Firstly, SPCEs were modified with boronic acid according to the procedure by Ho et al. (2011) with slight changes. Briefly, diazotation of ABA was performed with sodium nitrite in hydrochloric acid, the resulting 4-carboxybenzenediazonium ion solution was dropped onto the SPCE surface and the potential was cycled as described in Section 2. Fig. 2 shows the Nyquist plots obtained by electrochemical impedance spectroscopy using 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ as redox probe in 0.1 M KCl. As it can be seen, modification of the SPCE with ABA gave rise to a large increase in the electron transfer resistance ($R_{\text{CT}} = 3050\ \Omega$) as a consequence of the electrostatic repulsion between the redox probe and the negatively charged carboxylate groups. Thereafter, surface-confined carboxyl groups were activated with EDC/NHS and APBA moieties were attached to the electrode surface through the formation of amide bonds. This modification with APBA produced a dramatic decrease in the R_{CT} value ($307\ \Omega$) due to the neutralization of the electrode negative surface charge. Then, anti-ACTH antibodies were attached to the resulting APBA/SPCE through the oriented boronic acid-saccharide bonds. After a blocking step with BSA, a competitive assay between ACTH and biotinylated ACTH for the binding sites of the immobilized antibodies was accomplished. Strept-AP was used to detect the immunosensing event by adding 1-NPP as AP substrate and measuring the electrochemical oxidation of the

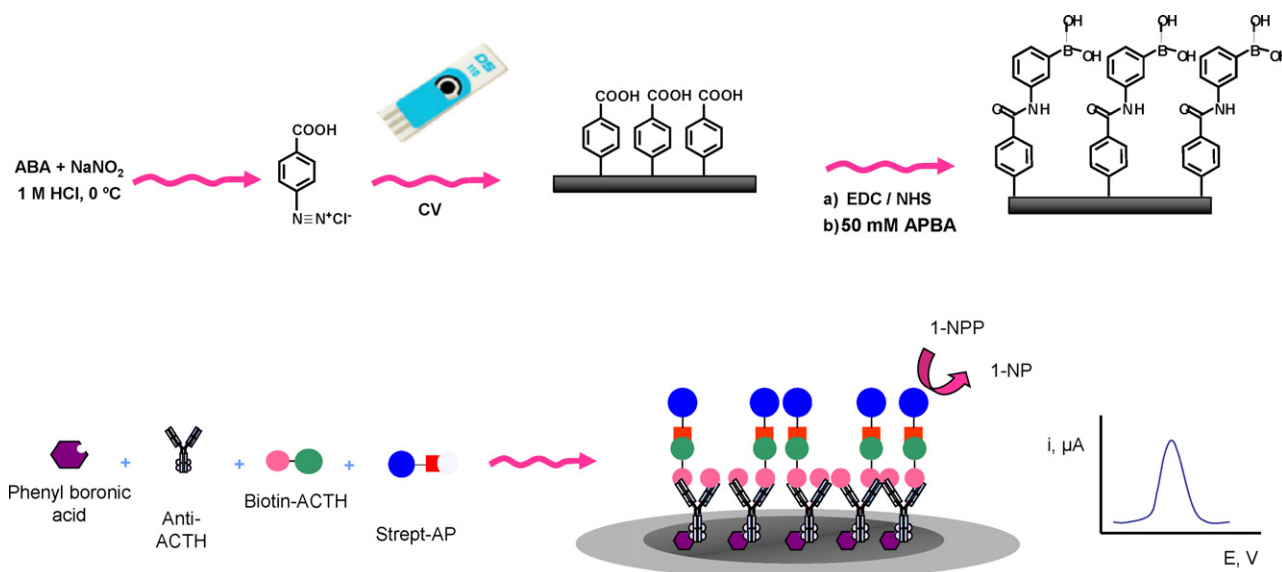


Fig. 1. Schematic display of the reactions and protocols involved in the development of disposable electrochemical immunosensors for ACTH using screen-printed electrodes modified with phenylboronic acid.

generated enzyme reaction product, 1-naphtol, by differential pulse voltammetry.

3.1. Optimization of the experimental variables involved in the immunosensor response to ACTH

All variables involved in the analytical performance of the immunosensor for ACTH were optimized. Firstly, the antibody loading onto the APBA/SPCE was evaluated by checking the voltammetric response obtained with different immunosensors, in the absence of ACTH, constructed upon deposition of 10 μ L of anti-ACTH solution prepared in the 5–40 μ g/mL antibody concentration range, and using 750 ng/mL Biotin-ACTH and 1 μ g/mL Strept-AP. Fig. S1 (suppl. material) shows as the measured i_p value increased with the antibody loading up to 30 μ g/mL reaching a saturated response for larger loadings. Therefore, 30 μ g/mL anti-ACTH was selected for further work to attain the highest possible sensitivity. Anti-ACTH-APBA/SPCEs were allowed to stay overnight at 8 °C. In order to avoid non-specific binding of immunoreagents on the electrode surface (Wang et al., 2008), a blocking step with BSA was accomplished. Accordingly, both the BSA concentration and the incubation time employed to block the free sites on the electrode surface were also optimized. The protocol consisted of dropping

10 μ L of 1, 2 or 5% BSA solutions, which were allowed to stand for 30, 60 or 120 min, onto the APBA/SPCEs and measuring the i_p values in the presence of 1500 ng/mL Biotin-ACTH and 2000 ng/mL Strept-AP. The obtained results (not shown) led us to choose a 2% BSA concentration and an incubation time of 60 min at room temperature as the optimum experimental conditions. Under these conditions unspecific responses were found to be always lower than 10% of the signals obtained with the Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE.

Another optimized variable was the concentration of Biotin-ACTH. In order to do that, different Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensors were prepared by incubating in Biotin-ACTH solutions with concentrations ranging in the 0–1500 ng/mL concentration range. The i_p values measured without ACTH showed an important increase from 0 to 750 ng/mL and a slight decrease for higher Biotin-ACTH concentrations (Fig. S2). Thus, 750 ng/mL was the selected value for further work. Moreover, the incubation time in the Biotin-ACTH solution was also evaluated in the 0 to 60 min interval by testing the voltammetric signal obtained with Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensors for 1 ng/mL ACTH. The largest peak current (results not shown) was obtained for 45 min and therefore, this was selected as the incubation time to be used. The effect of temperature in the incubation step was also investigated by recording DP voltammograms with immunosensors which were incubated at 8 °C, at room temperature, and at 38 °C. The obtained results (not shown) revealed that both the peak current and the reproducibility of the voltammetric responses decreased as the temperature increased, probably due to the lower stability of ACTH (Talbot et al., 2003). Thus, incubation in the Biotin-ACTH immunoreagent was accomplished at 8 °C.

In order to perform the competitive assay, Strept-AP was used. The conjugate concentration was optimized by testing the voltammetric response of different immunosensors incubated with Strept-AP in the 0 to 2000 ng/mL range. The obtained results (Fig. S3) revealed a regular current increase up to 1500 ng/mL whereas the peak current remained practically constant for larger conjugate concentrations. Therefore, 1500 ng/mL probably corresponded to saturation of the biotinylated ACTH with Strept-AP. Accordingly, in order to achieve the optimal experimental conditions to detect the competition between ACTH and Biotin-ACTH

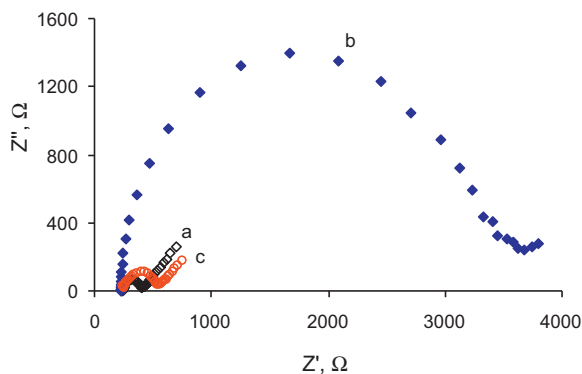


Fig. 2. Nyquist plots recorded from a 5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 0.1 M KCl solution at (a) bare SPCE, (b) 4-aminobenzoic acid-modified SPCE, (c) 3-aminophenylboronic acid-modified SPCE.

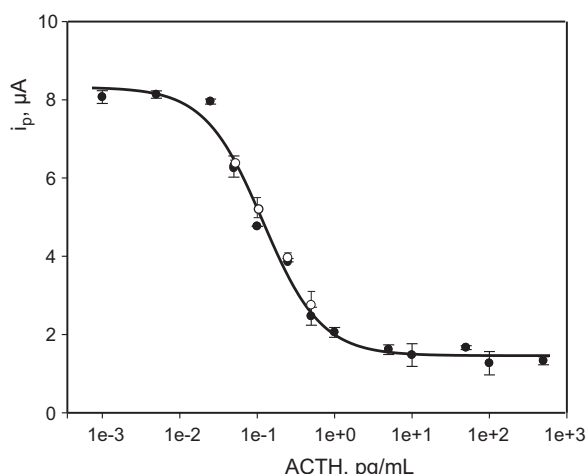


Fig. 3. Calibration plot for ACTH obtained with the Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensor. Open points correspond to the serum sample analysis.

for the anti-ACTH binding sites, a concentration of 2000 ng/mL Strept-AP was selected. Moreover, the incubation step was found to provide optimum results when it was carried out at 8 °C for 60 min (results not shown).

Furthermore, the voltammetric behaviour at the SPCE of different phenolic compounds (indoxyl, 4-aminophenol and 1-naphthol), which can be generated as alkaline phosphatase reaction products from their respective phosphate derivatives used as enzyme substrates, was checked. Cyclic voltammograms from 5.0 mM solutions of these phenolic compounds in Trizma buffer of pH 9.0 (results not shown) showed that the 1-naphthol irreversible oxidation reaction occurred at a remarkably less positive potential than those observed for the other compounds. Although the peak current measured for 1-naphthol was slightly lower than that obtained for the other phenolics, as a compromise between sensitivity and selectivity, 1-NPP was selected as the enzyme substrate to be used in this work. The influence of 1-NPP concentration on the differential pulse voltammetric responses of the Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensor is shown in Fig. S4. As it can be seen, the highest peak current value was obtained at 5 mM 1-NPP, which represents a relatively high concentration then ensuring that the enzyme reaction rate depended only on the enzyme concentration.

3.2. Analytical characteristics of the immunosensor for ACTH

Fig. 3 shows the calibration plot constructed for ACTH under the optimized working conditions stated above. Error bars displayed were calculated from measurements carried out with three different immunosensors, except in the case of the points corresponding to the absence of ACTH and in the EC_{50} value, where eight measurements were made (see below). The calculated errors were below 10% in all cases. The ACTH concentration tested ranged between 10^{-3} and 500 pg/mL ACTH. The i_p vs. ACTH concentration curve was fitted by non-linear regression using the Sigma Plot data analysis software (Coneely et al., 2007). The adjusted equation ($r = 0.995$) was:

$$i_p = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + EC_{50}/x} + i_{\min}$$

where i_{\max} and i_{\min} were the maximum and minimum peak current values of the calibration graph: $8.3 \pm 0.2 \mu A$ and $1.5 \pm 0.2 \mu A$, respectively. The EC_{50} value, which is the ACTH concentration corresponding to a fifty per cent competition, was 0.10 ± 0.02 pg/mL,

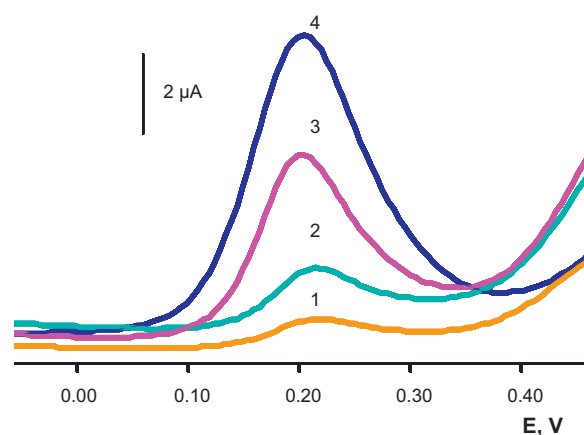


Fig. 4. Differential pulse voltammograms recorded with the Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensor for 0 (1), 0.05 (2), 0.50 (3), and 1.00 (4) pg/mL ACTH.

and the Hill slope, h , was -1.16 ± 0.15 . The observed range of linearity ranged between 0.025 and 1.0 pg/mL ($r = 0.990$), which is adequate for the analysis of clinical samples. A very low limit of detection, 18 pg/L ACTH was calculated from the equation:

$$LOD = EC_{50} \left(\frac{i_{\max} - i_{\min}}{i_{\max} - i_{\min} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

where s is the standard deviation ($n = 10$) of the zero value (the i_p value measured in the absence of ACTH), $\pm 0.28 \mu A$.

As an example of the voltammetric curves recorded, Fig. 4 displays the responses obtained for 0, 0.05, 0.50 and 1.00 pg/mL ACTH. It can be observed as concentrations of the hormone as low as 0.05 pg/mL yielded very good DP voltammetric signals.

The reproducibility of the DP voltammetric measurements was evaluated by carrying out assays with different immunosensors both for solutions containing no ACTH and for a 0.10 pg/mL (the EC_{50} value) ACTH concentration level on the same day and on different days. Relative standard deviation (RSD) values of 3.3 and 4.4% ($n = 8$) were obtained, respectively, for the assays performed on the same day, whereas the RSD values ($n = 8$) were 8.9% when no ACTH was present and 5.9% for 0.10 pg/mL ACTH when the measurements were carried out on different days. The storage stability of the APBA/SPCE modified electrodes, as well as that of anti-ACTH-APBA/SPCE and Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensors was also investigated. In order to do that, the different modified electrodes and immunosensors were prepared on the same day and stored in a refrigerator at 4 °C. Then, every electrode and bioelectrode was used to construct the corresponding immunosensor and to measure the voltammetric response for 5 mM 1-NPP in the absence of ACTH. Fig. 5 shows the results obtained during a period of time of 27 days for APBA/SPCE modified electrodes (●) and anti-ACTH-APBA/SPCE (○).

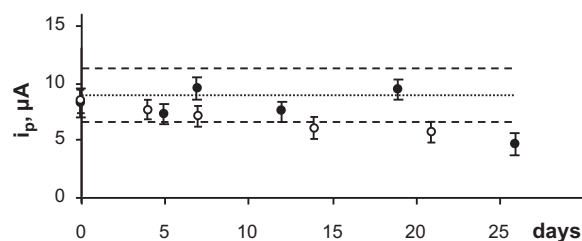


Fig. 5. Control chart constructed for APBA/SPCE (●) and anti-ACTH-APBA/SPCE (○). Each point corresponds to the mean value for three successive measurements of 5 mM 1-NPP.

Table 1

Cross-reactivity calculated from the EC₅₀ values for different hormones with the Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensor.

Compound	EC ₅₀ (ng/mL)	CR ^a (%)
ACTH	1.0×10^{-4}	100
Cortisol	0.47	0.02
Prolactin	1.11	0.01
Estradiol	13,733	7.3×10^{-7}
Testosterone	>20,000	$<5.0 \times 10^{-7}$
Progesterone	>20,000	$<5.0 \times 10^{-7}$
hGH	>20,000	$<5.0 \times 10^{-7}$

^aCR = 100 (EC₅₀) ACTH/(EC₅₀) interfering compound.

immunosensors (○). Each point in the displayed control chart corresponded to the mean value of three successive measurements. As it can be seen, the APBA/SPCE modified electrodes yielded voltammetric responses that remained inside the control limits set at $\pm 3s$ calculated for the whole series of experiments, for at least 18 days. However, a 63% of the initial current was observed on the 27th day. On the other hand, the DPV responses measured with anti-ACTH-APBA/SPCE immunosensors remained inside the control limits for 15 days and the current measured on the 21st day corresponded to 83% of the initial value. Regarding the bioelectrode containing all the bioconjugates used in the immunosensor functioning, Strept-AP-Biotin-ACTH-anti-ACTH-APBA/SPCE, its storage stability was much poorer retaining only a 30% of the initial value after five days from its preparation.

3.3. Cross-reactivity

Various hormones (cortisol, testosterone, β -estradiol, progesterone, human growth hormone (hGH), and prolactin) which may be present in biological fluids together with ACTH, were tested as potential interfering substances for the immunosensor response towards ACTH. The cross-reactivity was calculated from the EC₅₀ value for each tested compound and the obtained results are summarized in Table 1. As it can be observed, all the tested species gave very low % CR, with values lower than 0.01% except in the case of cortisol (0.02%). These results demonstrated the high selectivity of the developed immunosensor.

3.4. Determination of ACTH in certified serum samples

The usefulness of the immunosensor for the analysis of real samples was checked by analyzing a certified human serum sample. Calibration graphs were constructed from the reconstituted sample which was appropriately diluted to obtain 0.05, 0.10, 0.25 or 0.50 pg/mL ACTH. Fig. 3 shows this calibration graph superimposed on the calibration curve for ACTH obtained with standards. Errors bars were calculated in all cases for three different measurements. As it can be observed, the analytical responses overlapped completely in both calibration plots, with a linear portion for the calibration recorded with the serum sample exhibiting a slope value of $-1.54 \mu A$ ($r=0.997$) which was very similar to that obtained for ACTH standard solutions ($-1.52 \mu A$; $r=0.990$). Therefore, the determination of ACTH could be accomplished by interpolation of the measured ip values into the calibration plot obtained with ACTH standard solutions. The results obtained for the analyses carried out at the four concentration levels mentioned above were 0.050 ± 0.001 , 0.11 ± 0.02 , 0.23 ± 0.02 and 0.49 ± 0.015 pg/mL ACTH for five replicates, with recoveries ranging between 92 ± 3 and $106 \pm 4\%$. These results demonstrated the usefulness of the developed immunosensor for the analysis of low

ACTH concentrations in human sera with practically no sample treatment.

4. Conclusions

In this paper, the development of an electrochemical immunosensor for ACTH is reported for the first time. The immunosensing approach involves the immobilization of anti-ACTH onto phenylboronic acid-modified screen-printed carbon electrodes and a competitive immunoassay implying biotinylated ACTH and alkaline phosphatase labelled streptavidin. Moreover, a differential pulse voltammetric analytical response was used to monitor the affinity reaction. The developed design exhibits an excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, wide range of quantifiable antigen concentrations, and inter-assay reproducibility. Therefore, this immunosensor can be envisaged as a useful and affordable analytical tool for the rapid determination of ACTH in clinical applications, as it has been outlined with the results obtained for the analysis of certified human serum samples.

Acknowledgements

R. Villalonga acknowledge to Ramón & Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects DPS2008-07005-C02-01, CTQ2009-12650) and Comunidad de Madrid S2009/PPQ-1642, programme AVANSENS is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2012.02.015.

References

- Abad, J., Vélez, M., Santamaría, C., Guisan, J., Matheus, P., Vázquez, L., Gazaryan, I., Gorton, L., Gibson, T., Fernández, V., 2002. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12845–12853.
- Arya, S.K., Solankia, P.R., Datta, M., Malhotra, D.B., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2810–2817.
- Brossaud, J., Bouton, M., Gatta, B., Tabarin, A., Corcuff, J.B., 2011. *Clin. Biochem.* 44, 1160–1162.
- Carralero, V., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2007. *Anal. Chim. Acta* 596, 86–91.
- Centi, S., Laschi, S., Mascini, M., 2007. *Talanta* 73, 394–399.
- Coneely, G., Aherne, M., Lu, H., Guilbault, G.G., 2007. *Anal. Chim. Acta* 583, 153–160.
- Dobson, S., White, A., Hoadley, M., Lovgren, T., Ratcliffe, J., 1987. *Clin. Chem.* 33, 1747–1751.
- Eguilaz, M., Moreno-Guzmán, M., Campuzano, S., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 26, 517–522.
- Fowler, J.M., Wong, D.K.Y., Halsall, H.B., Heineman, W.R., 2008. In: Zhang, X., Ju, H., Wang, J. (Eds.), *Recent Developments in Electrochemical Immunoassays and Immunosensors*. Academic Press, pp. 115–143, Ch. 5.
- Guillemin, R., Vargo, T., Rossier, J., Minick, S., Ling, N., Rivier, C., Val, W., Bloom, F., 1977. *Science* 197, 1367–1369.
- Hao, C., Yan, F., Ding, L., Xue, Y., Ju, H., 2007. *Electrochem. Commun.* 9, 1359–1364.
- Ho, J.A., Hsu, W.A., Liao, W.C., Chiu, J.K., Chen, M.L., Chang, H.C., Li, C.C., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1021–1027.
- Norton, J.A., Li, M., Gillary, J., Le, H.N., 2001. *Curr. Prob. Surgery* 38, 448–545.
- Pingarrón, J.M., Yáñez-Sedeño, P., González-Cortés, A., 2008. *Electrochim. Acta* 53, 5848–5866.
- Talbot, J.A., Kane, J.W., White, A., 2003. *Ann. Clin. Biochem.* 40, 453–471.
- Tang, D.P., Su, B.L., Tang, J., Ren, J., Chen, G.N., 2010. *Anal. Chem.* 82, 1527–1534.
- Thevis, M., Bredehöft, M., Geyer, H., Kamber, M., Delahaut, P., Schänzer, W., 2006. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 3551–3556.
- Vogesser, M., Engelhardt, D., Jacob, K., 2000. *Clin. Chem.* 46, 1998–2000.
- Wang, Z., Tu, Y., Liu, A., 2008. *Talanta* 77, 815–821.
- Wang, J., 2007. *Electroanalysis* 19, 769–776.
- Yalow, R.S., Berson, S.A., 1971. *Biophys. Res. Commun.* 44, 439–445.

Multiplexed Ultrasensitive Determination of Adrenocorticotropin and Cortisol Hormones at a Dual Electrochemical Immunosensor



Multiplexed Ultrasensitive Determination of Adrenocorticotropin and Cortisol Hormones at a Dual Electrochemical Immunosensor

María Moreno-Guzmán, Araceli González-Cortés, Paloma Yáñez-Sedeño,* José M. Pingarrón

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain

*e-mail: yseo@quim.ucm.es

Received: February 2, 2012

Accepted: March 7, 2012

Abstract

A novel dual electrochemical immunosensor for the multiplexed determination of adrenocorticotropin (ACTH) and cortisol is reported. Aminophenylboronic acid-modified dual screen-printed carbon electrodes were prepared on which the corresponding ACTH and cortisol antibodies were immobilized. Competitive immunoassays involved biotinylated ACTH and alkaline phosphatase labelled streptavidin, or alkaline phosphatase labelled cortisol. Differential pulse voltammetry upon 1-naphthyl phosphate addition was employed to monitor the affinity reactions. The ranges of linearity were 5.0×10^{-5} –0.1 and 0.1–500 ng/mL for ACTH and cortisol. The usefulness of the dual immunosensor was demonstrated by analyzing certified human serum samples with good recoveries.

Keywords: Adrenocorticotropin, Cortisol, Electrochemical immunosensor, Phenyl boronic acid

DOI: 10.1002/elan.201200070

1 Introduction

Cortisol (hydrocortisone) is a glucocorticoid produced by the adrenal gland in response to stress and a low level of glucocorticoids in blood. Glucocorticoids play an essential role in the catabolism of peripheral fat, carbohydrates and proteins. In addition, cortisol has anti-inflammatory and immune modulatory effects. The secretion of cortisol is related to that of adrenocorticotropin hormone (ACTH) through corticotropin-releasing hormone (CRH). CRH is synthesized and secreted by the hypothalamus. It stimulates pituitary corticotrophic cells to produce ACTH, a 39-amino acid peptide, which is a fragment of the larger molecule proopiomelanocortin (POMC). ACTH promotes growth and hormone synthesis by the adrenal cortex, and stimulates secretion of glucocorticoids, mineralocorticoids and androgenic steroids [1]. As indicated in the scheme depicted in Figure 1 [2], the amount of cortisol secreted by the adrenal gland produces an inhibitory effect on both the synthesis and secretion of CRH and ACTH through a negative feedback loop to the hypothalamus and pituitary glands, respectively. Serum levels of ACTH fluctuate with larger peaks in the early morning and nadiring in the late afternoon or early evening, which results in a parallel diurnal rhythm of cortisol secretion, with peak serum levels in the morning and lower levels in the evening. Stress, pain, trauma, hypoxia, hypothermia and hypoglycemia can increase the serum levels of ACTH. Perturbations of the hypothalamus-pituitary adrenal axis result in different clinical forms of hypercortisolism, including Cushing's disease

(pituitary adenoma), ectopic ACTH, ectopic CRH, and primary adrenal causes [3]. The diagnosis of Cushing's syndrome remains nowadays as one of the most challenging problems in clinical endocrinology [4]. Among other causes, this is because clinical manifestations may overlap with many common clinical conditions. For example, studies have shown that 2–3% of patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus have unrecognised Cushing's syndrome [5]. This diagnosis requires biochemical confirmation of excess cortisol excretion and ACTH determination in order to classify patients with endogenous hypercortisolism into ACTH independent and dependent [6]. Different levels of ACTH and cortisol concentrations can be found in serum or urine depending on the type of disease. Typically, ACTH is decreased in adrenal-dependent Cushing's syndrome and maintained/elevated in Cushing's disease [7]. As an example, ACTH levels are undetectable or low (<5 pg/mL) and cortisol levels are high (>15 µg/dL) in patients with primary adrenal tumours or hyperplasia, whereas patients with corticotropin-dependent Cushing's syndrome have high plasma ACTH levels (>15 pg/mL). Therefore, the development of analytical methods able to provide multiplexed determination of ACTH and cortisol hormones should help to perform a faster classification of the patients as well as an easier diagnosis of this kind of diseases. Nevertheless, these methodologies require to be sufficiently sensitive, robust and selective [8].

Radioimmunoassays and immunochemiluminiscence assays are the most often used methodologies for clinical determination of cortisol and ACTH independently [4,7].

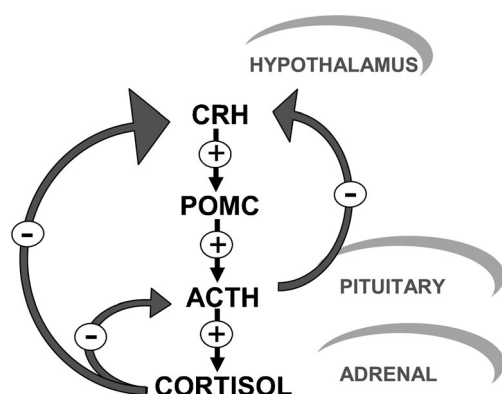


Fig. 1. Diagram illustrating the hypothalamus, pituitary and adrenal axis, and the stimulating or negative feedback from CRH, POMC, ACTH and cortisol. Modified from [2].

However, in some cases, the assays are not sensitive enough to determine the low concentrations of ACTH involved in ACTH-independent Cushing's syndrome [7].

Because of their high sensitivity, rapid response and usability, electrochemical immunosensors have demonstrated to be excellent alternatives in clinical analysis of selected analytes [9,10]. Our group has developed recently electrochemical immunosensors for the determination of some hormones. For example, testosterone was determined in serum using configurations based on the immobilization of anti-testosterone antibodies on gold nanoparticles-carbon nanotubes-Teflon composite electrodes [11]. Magnetic electrochemical immunosensors were also developed for testosterone [12], prolactin [13] and cortisol [14]. Moreover, the ultrasensitive detection of ACTH was accomplished by using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors [15].

In this paper, we report the preparation of a dual electrochemical immunosensor for the multiplexed determination of ACTH and cortisol, which satisfies the requirements of sensitivity, selectivity and reproducibility needed for clinical applications. Aminophenylboronic acid-modified electrodes were prepared on which the corresponding ACTH and cortisol antibodies were immobilized. Competitive immunoassays were then performed and differential pulse voltammetry upon 1-naphthyl phosphate addition was employed to monitor the affinity reactions. The usefulness of the approach was demonstrated by its application to serum samples.

2 Experimental

2.1 Apparatus and Electrodes

Electrochemical measurements were carried out using an 1030 B Electrochemical Analyzer from CH Instruments. Dual screen-printed electrodes (C 1110 DropSens, Oviedo, Spain) consisted of two elliptic carbon working electrodes, a carbon counter electrode and a silver pseudo-reference electrode. All experiments were per-

formed at room temperature. A P-Selecta ultrasonic bath, and a P-Selecta Agimatic magnetic stirrer, all distributed by Scharlab, Madrid, Spain, were also used.

2.2 Reagents and Solutions

Anti-ACTH C-terminal was purchased from Fitzgerald MA, USA. 1.05 mg/mL solutions were prepared in phosphate buffer solution of pH 7.4 (PBS). Diluted solutions of both ACTH (Genway Biotech, CA, USA) and biotinylated ACTH (Biotin-ACTH) (AnaSpec, CA, USA) were prepared in PBS. Murine monoclonal anti-cortisol was from East Coast Bio, ME, USA. 2.39 mg/mL solutions were prepared in PBS. Cortisol labelled with alkaline phosphatase in position 3 (cortisol-AP), with an enzyme activity of 1840 U/mg, was obtained from Cal Bioreagents, CA, USA. Diluted solutions were prepared daily in Tris buffer solution of pH 7.2 which also contained 2% BSA. A 500 µg/mL stock solution of unlabelled cortisol (Aldrich > 98%) in methanol was prepared. More diluted solutions were prepared in Tris buffer solution of pH 7.2. A 50 mM Tris (Scharlau, 99%) and 20 mM NaCl (Scharlau, 99%) buffer solution of pH 7.2, and a 0.1 M Trizma base (Sigma, 99%) and 1 mM magnesium chloride (Panreac, 99%) buffer solution of pH 9.0, were employed. 1-Naphthyl phosphate monosodium salt monohydrate (1-NPP, Sigma) was also used. 0.05 M 1-NPP solutions were prepared daily in Trizma base buffer of pH 9.0. BSA (Gerbu, type VH) was also used. 2% BSA solutions in both PBS and Tris buffer solution of pH 7.2 were used. Streptavidin labelled with alkaline phosphatase (Strept-AP) (Sigma) was also employed. Diluted solutions were prepared in Tris buffer solution of pH 7.2. 4-Aminobenzoic acid (ABA, Across), 4-amino phenyl boronic acid (APBA, Sigma), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydro-chloride (EDC) (Sigma) and *N*-hydroxy-succinimide (NHS) (Sigma) were also used.

2.3 Samples

Samples containing different ACTH and cortisol mixtures were analyzed. These were prepared from certified lyophilised human sera containing 10 µg/mL ACTH (NIBSC, 74/555) or 277 ng/mL cortisol (European Reference Materials, ERM-DA 193, Sigma), in the reconstituted serum, respectively.

2.4 Procedures

2.4.1 Modification of Dual SPC Electrodes

Figure 2a displays a scheme of the employed procedure. Firstly, 20 mg of 4-aminobenzoic acid were dissolved in 2 mL 1 M HCl and cooled with ice. Then, the corresponding diazonium salt was prepared by adding dropwise a 2 mM NaNO₂ aqueous solution (38 µL for each 200 µL of 4-aminobenzoic acid solution) with constant stirring. Next, 40 µL of the resulting solution were spotted onto

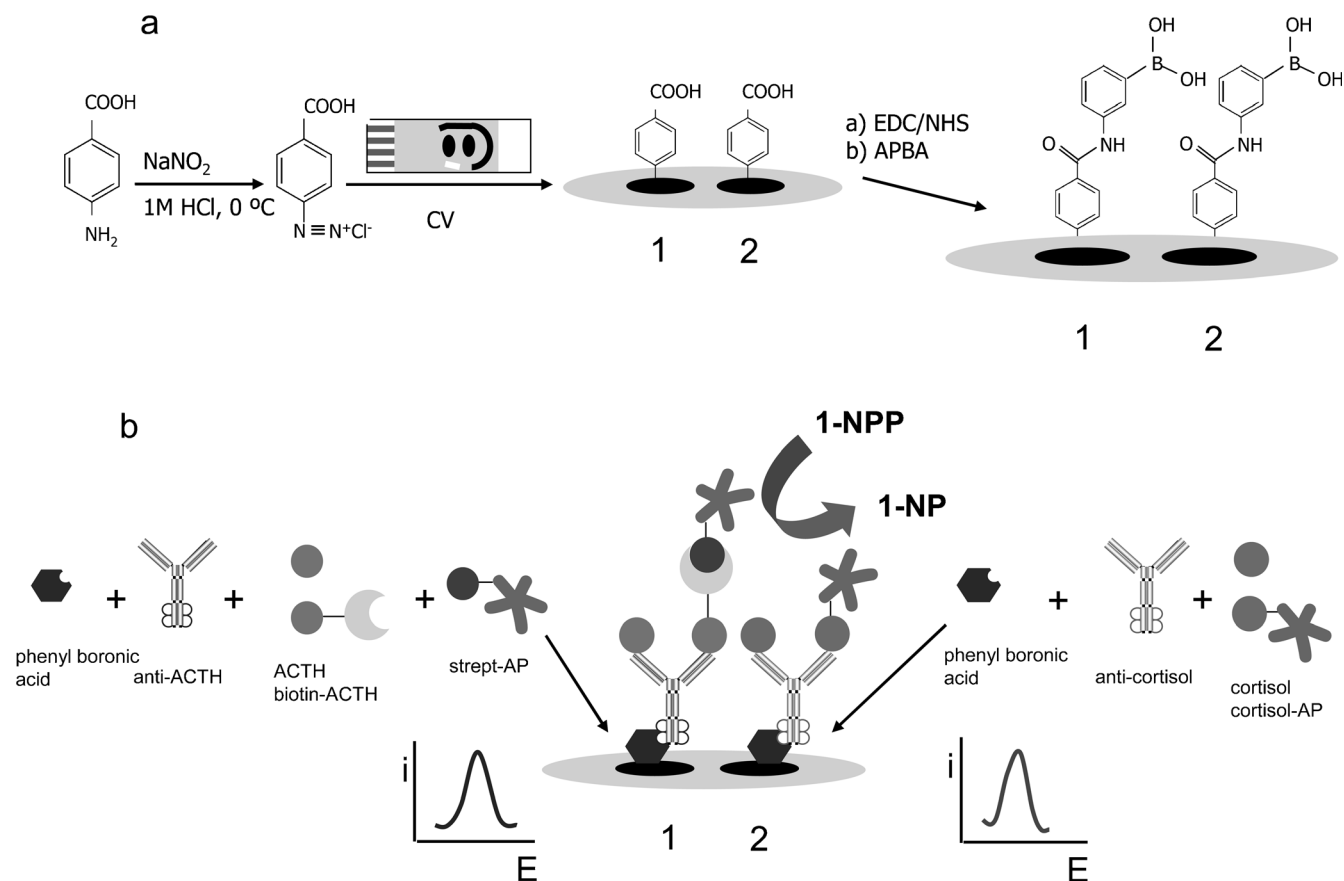


Fig. 2. Schematic picture for the preparation of the dual electrochemical immunosensor for multiplexed determination of ACTH and cortisol.

the SPC electrodes and ten successive voltammetric cycles from 0.0 to -1.0 V ($v=200$ mV/s) were scanned. Finally, the modified electrodes were washed thoroughly with water and methanol, and dried at room temperature. In a second step, $10\text{ }\mu\text{L}$ of an EDC/NHS mixture (0.1 M each) aqueous solution were spotted onto the modified electrodes and left to react for 1 h. After rinsing with water and methanol and allowing drying, $10\text{ }\mu\text{L}$ of a 50 mM 3 -aminophenylboronic acid were placed onto the electrodes. After 3 h incubation, the resulting aminophenylboronic acid-modified electrodes (APBA/SPCEs) were thoroughly rinsed with water and methanol and allowing drying at room temperature.

2.4.2 Preparation of the Immunosensors

ACTH and cortisol immunosensors were prepared on APBA/SPCE1 and APBA/SPCE2 modified electrodes, respectively. $4\text{ }\mu\text{L}$ of $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ anti-ACTH and $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ anti-cortisol solutions in PBS were dropped onto the respective electrode and left stand overnight at 8°C . Then, $4\text{ }\mu\text{L}$ of a 2% BSA blocking solution were deposited onto both electrodes and incubation was allowed for 1 h at room temperature. Competitive immunoassays were performed by spotting $4\text{ }\mu\text{L}$ of a mixture solution of ACTH (or the sample) and $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ biotinylated-ACTH (biotin-

ACTH) on the anti-ACTH/APBA/SPCE1 electrode, and $4\text{ }\mu\text{L}$ of a mixture solution of cortisol (or the sample) and $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ alkaline phosphatase-labelled cortisol 2% BSA (AP-cortisol) on the anti-cortisol/APBA/SPCE2 electrode allowing incubation at both electrodes for 45 min at 8°C . Thereafter, $4\text{ }\mu\text{L}$ of $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ alkaline phosphatase-labelled streptavidin (Strept-AP) and $4\text{ }\mu\text{L}$ of Tris buffer solution of pH 7.2 were added to the Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 and the cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2, respectively. After 60 min incubation at 8°C , $45\text{ }\mu\text{L}$ Trizma buffer plus $5\text{ }\mu\text{L}$ of 0.05 M 1 -NPP solution were deposited onto the electrodes and allowed to stand for 8 minutes. Differential pulse voltammograms were recorded over the -0.15 to $+0.60$ V range to obtain the electroanalytical signals.

2.4.3 Multiplexed Determination of ACTH and Cortisol in Serum

Lyophilised human sera containing ACTH or cortisol were reconstituted, respectively, in 2.5 mL or 1.25 mL Milli-Q water to obtain $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ACTH, or 277 ng/mL cortisol stock solutions. From these stock solutions, different ACTH-cortisol mixtures also containing Biotin-ACTH or cortisol-AP conjugates were prepared and spotted on the anti-ACTH/APBA/SPCE1 anti-cortisol/

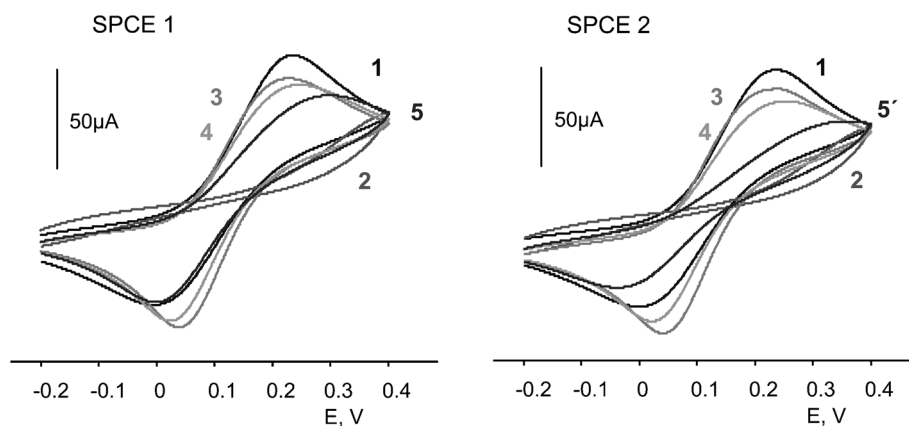


Fig. 3. Cyclic voltammograms recorded for a 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0.1 M KCl solution at (1) bare SPCE; (2) ABA/SPCE; (3) activated ABA/SPCE; (4) APBA/SPCE; (5) anti-ACTH/APBA/SPCE; (5') anti-cortisol/APBA/SPCE; $v = 100$ mV/s.

APBA/SPCE2 electrodes. Thereafter, ACTH and cortisol were simultaneously determined by applying the procedure described above which involved simultaneous measurement of the respective DPV peak current values at each electrode and interpolation into the linear portion of the corresponding calibration plot obtained with ACTH or cortisol standard solutions.

3 Results and Discussion

The methodologies employed in the design and functioning of the dual immunosensor are illustrated in Figure 2. As it is described in Section 2.4.1, firstly, SPCE1 and SPCE2 were modified with boronic acid as described in the Experimental section (Procedure 2.4.1.). Subsequently, anti-ACTH and anti-cortisol antibodies were attached to the resulting APBA/SPCEs through the oriented boronic acid-saccharide bonds [16]. After a blocking step with BSA, competitive assays between ACTH and Biotin-ACTH, and between cortisol and cortisol-AP for the binding sites of the respective antibodies were accomplished. In the case of the ACTH immunosensor a further conjugation with streptavidin labelled with alkaline phosphatase was carried out. In both cases, 1-NPP was employed as AP substrate to detect the immunosensing events and the electrochemical oxidation of the generated enzyme reaction product, 1-naphtol, was measured by differential pulse voltammetry. Cyclic voltammetry from a 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0.1 M KCl solution was employed to characterize the modified electrode surface of SPCE1 and SPCE2 upon the different modification steps (Figure 3). As expected, voltammograms 1 to 4 were similar at both electrodes.

Modification of SPCEs with ABA produced a sharp decrease in the voltammetric response due to the electrostatic repulsion between the redox probe and the negatively charged carboxylate groups. Upon activation of the surface-confined carboxyl groups with EDC/NHS and attachment of APBA moieties to the electrode surface

through the formation of amide bonds (voltammograms 3 and 4), an increase in the voltammetric response to the redox probe was observed as a consequence of the electrode negative surface charge neutralization. Conversely, the peak current measured at the anti-ACTH/APBA/SPCE1 (curve 5) was remarkably higher than that obtained with the anti-cortisol/APBA/SPCE2 (curve 5'), thus reflecting differences in the antibodies loadings and characteristics.

3.1 Optimization of the Experimental Variables Involved in the Immunosensors Responses

All variables involved in the electroanalytical responses of the dual immunosensor for ACTH and cortisol were optimized. Firstly, the respective antibody loadings into the APBA/SPCE1 and APBA/SPCE2 were evaluated by checking the DP voltammetric responses obtained with different immunosensors prepared with no ACTH or cortisol and by spotting 4 μL of anti-ACTH or anti-cortisol solutions prepared in the 0 to 80 $\mu\text{g/mL}$ antibody concentration range, respectively. 1 $\mu\text{g/mL}$ Biotin-ACTH M 1-NPP were used in these experiments. Figure 4a shows as the measured i_p values increased both at the ACTH and cortisol immunosensors with the antibody loading, exhibiting a remarkably lower increase from 30 $\mu\text{g/mL}$ anti-ACTH and 50 $\mu\text{g/mL}$ anti-cortisol. Therefore, these antibodies loading values were selected for further work. Furthermore, anti-ACTH/APBA/SPCE1 and anti-cortisol/APBA/SPCE2 were allowed to stay overnight at 8 $^{\circ}\text{C}$.

In order to reduce non-specific binding of immunoreagents on the electrodes surfaces, a blocking step with BSA was accomplished. In a first approach, the experimental conditions optimized previously for ACTH (2% BSA and 1h incubation time) [15] were used. Although the unspecific responses from Strept-AP at SPCE were found to be always lower than 10% of the signals obtained with the Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE, the nonspecific binding was remarkably higher when cortisol-AP was involved. Figure 5 displays

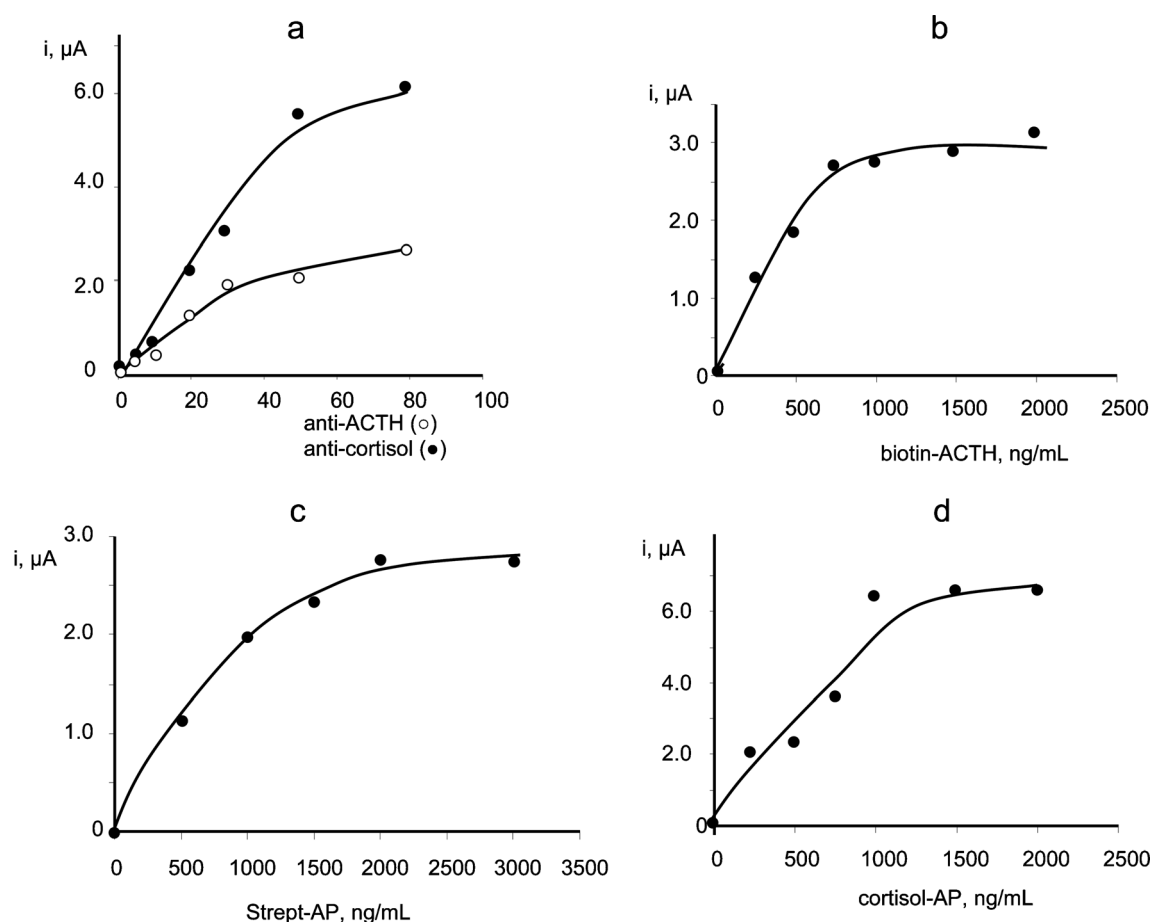


Fig. 4. Optimization of the different experimental variables involved in the preparation of the dual immunosensor for ACTH and cortisol.

DP voltammograms recorded at SPCEs from cortisol-AP solutions without blocking with BSA (curve 1) and with a blocking step with 2% BSA for different incubation times (curves 2 and 3). The DP voltammograms recorded upon spotting a cortisol-AP-2% BSA mixture solution with and without a further incubation step with 2% BSA are also displayed (curves 4 and 5). As it can be observed, the lower unspecific signal was obtained when the cortisol-AP solution was prepared in the presence of 2% BSA, and the electrode was also blocked with 2% BSA during 1 h incubation time. Using these experimental conditions, Figure 5b compares the differential pulse voltammograms obtained in the measurement of the specific response of the cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE immunosensor for 0 ng/mL cortisol (curve 1) and 250 ng/mL cortisol (curve 2), with the unspecific voltammetric signal (curve 3). As it can be seen, a large analytical signal-to-background current ratio could be obtained thus allowing the sensitive determination of cortisol to be performed with the dual immunosensor.

The concentration of Biotin-ACTH was optimized by preparing various Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE immunosensors which were incubated in Biotin-ACTH solutions with different concentrations

ranging between 0 and 2 $\mu\text{g/mL}$. Figure 4b shows as the DP peak current measured for 0 ng/mL ACTH exhibited a rapid increase from 0 to 0.75 $\mu\text{g/mL}$ and levelled off for higher Biotin-ACTH concentrations. Accordingly, 1 $\mu\text{g/mL}$ Biotin-ACTH concentration was selected for further work. Moreover, 45 min at 8 °C was the optimized value for incubation of the anti-ACTH/APBA/SPCE immunosensors with the Biotin-ACTH solution (results not shown).

As it was illustrated in Figure 1, Strept-AP was used as the labelled protein in the immunosensor design to determine ACTH. The conjugate concentration was optimized by testing the voltammetric response of different immunosensors incubated with Strept-AP in the 0 to 3 $\mu\text{g/mL}$ range. The obtained results (Figure 4c) revealed a rapid current increase up to 2 $\mu\text{g/mL}$ Strept-AP and a practically constant value for larger conjugate concentrations. Therefore, that concentration, which probably corresponded to the saturation of the biotinylated ACTH, was selected for further work. Moreover, optimal results were achieved when the incubation step with the Strept-AP solution was performed at 8 °C for 60 minutes (results not shown).

Similarly, the cortisol-AP concentration was optimized in the case of the cortisol immunosensor preparation.

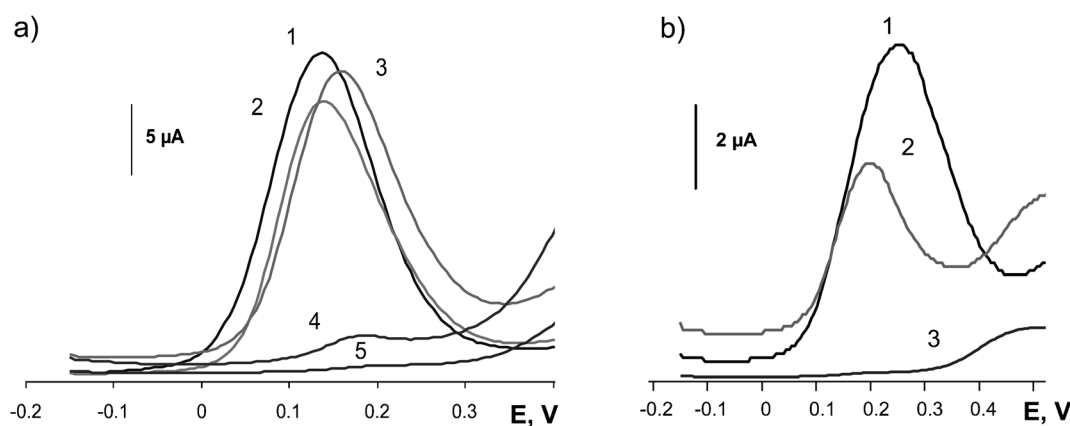


Fig. 5. a) Unspecific DPV responses from 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP at SPCEs (1); 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP and 1 h incubation in 2% BSA (2); 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP and 2 h incubation in 2% BSA (3); 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP + 2% BSA (4); 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP + 2% BSA and 1 h incubation in 2% BSA (5); 0.05 M 1-NPP; b) Specific (1), competitive (2) and unspecific DPV responses obtained with an anti-cortisol/APBA/SPCE immunosensor for 0 ng/mL (1) and 250 ng/mL (2) cortisol; the unspecific response (3) was measured as in a) (5). 50 $\mu\text{g/mL}$ anti-cortisol; 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP; 0.05 M 1-NPP.

This was made by checking the DP voltammetric response of various immunosensors incubated with the conjugate in the 0 to 2 $\mu\text{g/mL}$ concentration range. Figure 4d shows a rapid increase in the ip value with the conjugate concentration at the lower cortisol-AP concentration values reaching a constant response from 1 $\mu\text{g/L}$, indicating saturation of the antibodies binding sites. Using this conjugate concentration, an incubation time of 45 min at 8°C resulted appropriate to allow an adequate competition between cortisol and cortisol-AP for the binding positions of anti-cortisol.

As it was mentioned already, 1-NPP was the alkaline phosphatase substrate employed to generate the enzymatic product suitable to be voltammetrically detected at the modified electrodes surface for both immunosensors [14]. Thus, the influence of 1-NPP concentration on the simultaneous differential pulse voltammetric responses of both the Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 and cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2 immunosensors was evaluated in the 5×10^{-6} to 0.1 M range (results not shown). The highest peak current values were achieved using a 50 mM 1-NPP concentration, which represented a relatively high value suitable to ensure that the enzyme reaction rate depended only on the enzyme concentration. Finally, 8 min was selected as an optimal hydrolysis time of the enzyme substrate. The possible cross-talk between the two SPCEs and reaction products was evaluated by recording DP voltammograms at the immunosensors where mixture solutions of ACTH and cortisol were deposited. Figure 6 compares the voltammograms recorded from 50 ng/mL ACTH plus 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP (curve 1) and only 1 $\mu\text{g/mL}$ cortisol-AP (curve 2) at the cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2. Similarly, voltammograms recorded with the Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 for both 500 ng/mL cortisol plus 1 $\mu\text{g/mL}$ Biotin-ACTH (curve 3) and only 1 $\mu\text{g/mL}$ Biotin-ACTH (curve 4) are also displayed in Figure 6. As it can be observed, no significant differences in the vol-

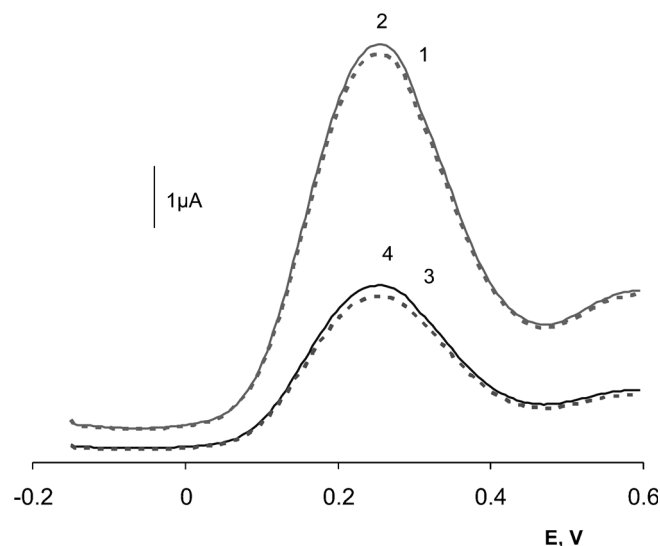


Fig. 6. DPV responses from: cortisol-AP + ACTH/anti-cortisol/APBA/SPCE2 (curve 1 ----); cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2 (curve 2 —); Strept-AP/Biotin-ACTH + cortisol/anti-ACTH/APBA/SPCE1 (curve 3 ----); Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 (curve 4 —).

tammometric responses with each immunosensor were found in the presence and in the absence of the non-target analyte, thus demonstrating that no appreciable cross-talking occurred with the developed dual immunosensor.

3.2 Analytical Characteristics for ACTH and Cortisol Determination with the Dual Immunosensor

Figure 7 shows the calibration plots for ACTH and cortisol obtained by differential pulse voltammetry under the optimized conditions stated above. The concentrations of ACTH and cortisol were measured between the 5×10^{-8} –0.1 and 5×10^{-4} – 5×10^3 ng/mL ranges, respectively. The corresponding analytical characteristics are summarized

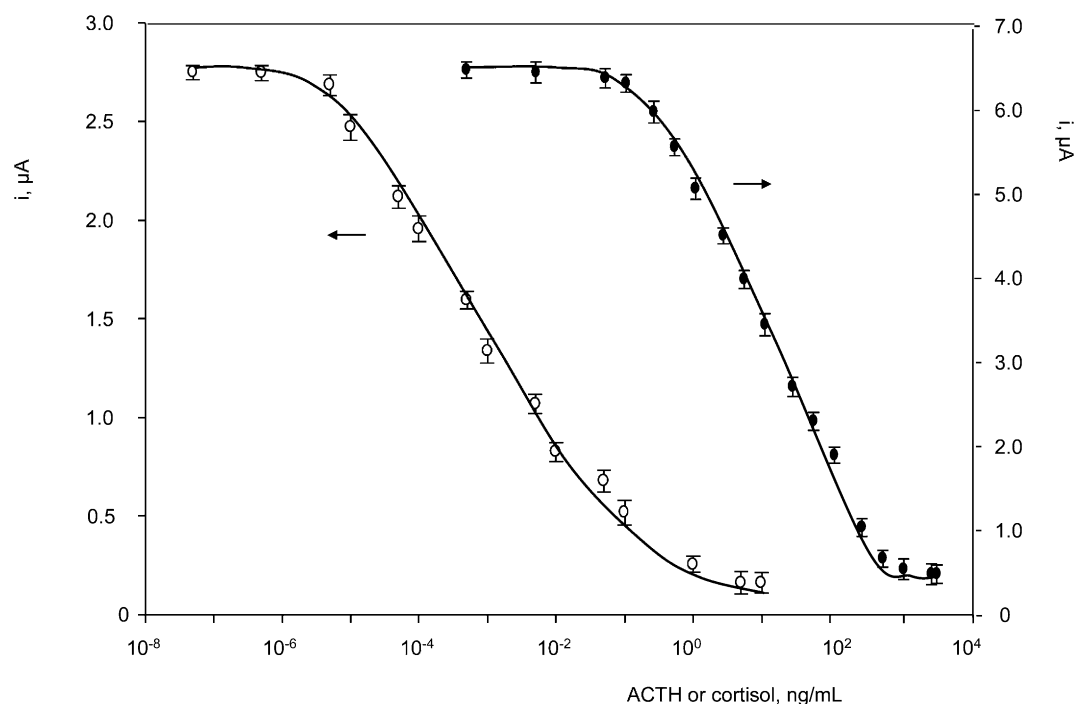


Fig. 7. Calibration plots for ACTH (○) and cortisol (●) obtained with the Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 and cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2 immunosensors.

in Table 1. The i_p vs. concentration curves were fitted by non-linear regression using the Sigma Plot data analysis software. The adjusted equation was:

$$y = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + (EC_{50}/x)^h} + i_{\min}$$

with $r=0.998$ (ACTH) and $r=0.999$ (cortisol), where i_{\max} and i_{\min} were the maximum and minimum current values of the calibration graphs: 2.92 ± 0.07 and $0.093 \pm 0.006 \mu\text{A}$, respectively, for ACTH, and 6.64 ± 0.01 and $0.038 \pm 0.008 \mu\text{A}$, respectively, for cortisol. As can be seen in Table 1, both calibration graphs provided wide linear concentration ranges, this being in agreement with the low Hill slope values [17]. The limits of detection were calculated from the equation [18]:

$$LOD = EC_{50} \left(\frac{i_{\max} - i_{\min}}{i_{\max} - i_{\min} - 3s} - 1 \right)^{-1/h}$$

where s is the standard deviation ($n=10$) of the zero value (the i_p value measured in the absence of ACTH or

cortisol). This value was $\pm 0.24 \mu\text{A}$ for ACTH and $\pm 0.12 \mu\text{A}$ for cortisol, with relative standard deviations of 6.3% ($n=5$) for both compounds. Accordingly, LOD values of 40 pg/L ACTH and 37 pg/mL cortisol were achieved. These analytical characteristics are much better than those reported previously in the literature for the individual determination of ACTH or cortisol using other approaches and similar to those reported recently by our group. In fact, various immunoassays were proposed for the determination of ACTH based on different antibodies and using radioactivity, chemiluminescence or fluorescence as detection techniques. These methodologies allowed ranges between a few units up to various hundreds of ng/L ACTH to be covered [19–21], concentrations that are much larger than those appearing in the linear range obtained for this hormone with the developed Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 immunosensor. On the other hand, the electrochemical immunosensor for ACTH previously described by our group provided a detection limit of 18 pg/L [15]. This slight difference is most likely due to the remarkably smaller surface area of the SPCE working electrodes in the dual device (5.6 mm^2) with respect to that of the single SPCE used for the individual determination of ACTH (12.56 mm^2).

Table 1. Analytical characteristics of the multiple electrochemical immunosensor for the simultaneous determination of ACTH and cortisol.

Analyte	Linear range (ng/mL)	r	EC_{50} (ng/mL)	Hill slope	LOD (pg/mL)
ACTH	5.0×10^{-3} –0.1	0.991	0.0007 ± 0.0002	-0.37 ± 0.03	0.04
Cortisol	0.1–500	0.996	12 ± 2	-0.50 ± 0.03	37

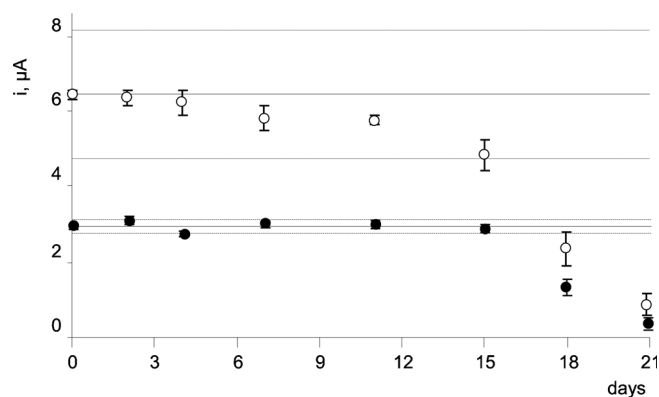


Fig. 8. Control chart constructed for anti-ACTH/APBA/SPCE1 (●) and anti-cortisol/APBA/SPCE2 (○). Each point corresponds to the mean value for three successive measurements of 5 mM 1-NPP.

Regarding cortisol, the limit of detection achieved in this work with the cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2 immunosensor was one half of the smallest reported value (72 pg/mL) obtained by a non-competitive colorimetric ELISA using cortisol-poly(L-lys) conjugates and HRP-cortisol [22]. Comparing with a previous immunosensor reported by our group using SPCEs and protein-A functionalized magnetic microparticles [14], the limit of detection is approximately ten times higher but the range of linearity is wider. This difference is due not only to the smaller electrochemical surface area of SPCE2 compared with the conventional SPCEs used in [14], but also to the ability of magnetic microparticles to immobilize a high concentration of biomolecules onto the electrode surface allowing the achievement of high sensitivities.

It is important to remark that the limits of detection achieved for both analytes with the dual immunosensor fulfils the requirements for the analysis of the hormones in human serum considering that in typical diseases the ACTH and cortisol concentrations are around 0.005 ng/mL and 150 ng/mL, respectively.

The reproducibility of the DP voltammetric measurements was evaluated by carrying out repetitive assays in the same day and in different days for solutions containing no ACTH or cortisol and for 1 pg/mL ACTH or 10 ng/mL cortisol (concentrations similar to the respective EC_{50} values). Relative standard deviation (RSD) values of 6.3% ($n=8$) were obtained for the assays performed on the same day with both ACTH and cortisol immunosensors, whereas the RSD values ($n=8$) were 7.6% when no ACTH was present and 8.5% for 1 pg/mL ACTH, and 7.9% without cortisol and 8.1% for 10 ng/mL cortisol, when the measurements were carried out on different days. The storage stability of the anti-ACTH/APBA/SPCE1, Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1, anti-cortisol/APBA/SPCE2 and cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2 immunosensors was also evaluated. In order to do that, different bioelectrodes were prepared on the same day and stored in a refrigerator at 4°C. Then, each bioelectrode was used to construct

the corresponding immunosensor and to measure the voltammetric response for 5 mM 1-NPP in the absence of ACTH or cortisol. As an example, Figure 8 shows the control chart displaying the results obtained for a period of time of 21 days for anti- ACTH/APBA/SPCE1 (●) and anti-cortisol/APBA/SPCE2 (○) immunosensors. Each point in the control chart represented the mean value of three successive measurements and the control limits were set at ± 3 times the standard deviation calculated for the whole series of experiments. As it can be seen, both bioelectrodes yielded voltammetric responses that remained inside the control limits for 15 days. On the other hand, the storage stability of the bioelectrodes constructed with all the bioconjugates, Strept-AP/Biotin-ACTH/anti-ACTH/APBA/SPCE1 and cortisol-AP/anti-cortisol/APBA/SPCE2 was much poorer retaining only approximately 30% of the initial value after twelve days from their preparation.

3.3 Simultaneous Determination of ACTH and Cortisol in Certified Human Sera

The usefulness of the dual immunosensor for the multiplexed analysis of real samples was evaluated by analyzing certified human serum samples. Calibration graphs for ACTH and cortisol were constructed from the reconstituted serum by appropriate dilution with the respective working buffer solutions in the 0.01 to 100 pg/mL ACTH and 0.1 to 200 ng/mL cortisol concentration ranges. It was observed that the calibration graphs constructed in diluted sera fitted perfectly with the calibration graphs obtained with standard solutions of the analytes depicted in Figure 6. Actually, the linear ranges of the calibration plots recorded with the serum samples exhibited slope values of $-0.507 \pm 0.006 \mu\text{A}$ ($r=0.999$) for ACTH, and $-1.6 \pm 0.1 \mu\text{A}$ ($r=0.998$) for cortisol, which were very similar to those obtained for ACTH and cortisol standard solutions ($-0.510 \mu\text{A}$ and $-1.59 \mu\text{A}$). These results, showing that no significant matrix effect existed, allowed the simultaneous determination of ACTH and cortisol to be performed by interpolation of the measured i_p values into the calibration plots constructed with ACTH and cortisol standard solutions. The results obtained in the analyses carried out at four different concentration levels for each hormone in the samples are summarized in Table 2. As it can be seen, recoveries ranged between 98.3 ± 0.1 and $102 \pm 3\%$ for ACTH and 99 ± 9 and $104 \pm 8\%$ for cortisol. These results demonstrated fairly well the usefulness of the developed dual immunosensor for the multiplexed analysis of low ACTH and cortisol concentrations in human sera with practically no sample treatment.

4 Conclusions

In this paper, the development of an electrochemical multiple-analyte immunosensor for the ultrasensitive multiplexed determination of ACTH and cortisol hormones in

Table 2. Simultaneous determination of ACTH and cortisol in certified human sera.

ACTH (pg/mL)	Added			Found	
	Cortisol (ng/mL)	ACTH (pg/mL)	Recovery (%)	Cortisol (ng/mL)	Recovery (%)
0.01	0.1	0.0102 ± 0.0005	99 ± 5	0.099 ± 0.009	99 ± 9
0.1	2.5	0.102 ± 0.003	102 ± 3	2.6 ± 0.2	104 ± 8
10	100	10.0 ± 0.1	100 ± 1	103 ± 5	103 ± 5
100	200	98.3 ± 0.1	98.3 ± 0.1	204 ± 7	102 ± 4

human serum is reported for the first time. The immunosensing approach involves the immobilization of anti-ACTH or anti-cortisol onto phenylboronic acid-modified dual screen printed carbon electrodes, competitive immunoassay implying biotinylated ACTH and alkaline phosphatase labelled streptavidin, or alkaline phosphatase labelled cortisol. and differential pulse voltammetric transduction of the affinity reactions. The developed dual immunosensor exhibits excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity, wide range of quantifiable antigen concentrations, and inter-assay reproducibility. Therefore, this multiple-analyte immunosensor can be envisaged as a useful and affordable analytical tool for the rapid determination of ACTH and cortisol in clinical applications, as it has been outlined with the results obtained for the analysis of certified human serum samples.

Acknowledgements

Financial support from the *Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación* (Projects DPS 2008-07005-C02-01, CTQ 2009-12650, CTQ 2009-09351) and *Comunidad de Madrid* S2009/PPQ-1642, programme AVANSENS is gratefully acknowledged.

References

- [1] E. Davies, C. J. Keyon, R. Fraser, *Steroids* **1985**, *45*, 557.
- [2] J. A. Norton, M. Li, J. Gillary, H. N. Le, *Curr. Probl. Surg.* **2001**, *38*, 487.
- [3] E. R. Laws, *Neurosurgery* **1999**, *45*, 977.
- [4] M. John, A. R. Lila, T. Bandgar, P. S. Menon, N. S. Shah, *Pituitary* **2010**, *13*, 48.
- [5] G. Leibowitz, A. Tsur, S. D. Chayen, M. Salameh, I. Raz, E. Cerasi, D. J. Gross, *Clin. Endocrinol.* **1996**, *44*, 717.
- [6] J. Newell-Price, P. Trainer, M. Besser, A. Grossman, *Endocrine Rev.* **1998**, *19*, 647.
- [7] J. Brossaud, M. Bouton, B. Gatta, A. Tabarin, J.-B. Corcuff, *Clin. Biochem.* **2011**, *44*, 1160.
- [8] M. S. Wilson, W. Y. Nie, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6476.
- [9] J. M. Fowler, D. K. Y. Wong, H. B. Halsall, W. R. Heineman, in *Recent Developments in Electrochemical Immunoassays and Immunosensors* (Eds: X. Zhang, H. Ju, J. Wang), Academic Press, New York **2008**, ch. 5, pp. 115–143.
- [10] P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 1749.
- [11] V. Serafin, M. Eguílaz, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 169.
- [12] M. Eguílaz, M. Moreno-Guzmán, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 517.
- [13] M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *692*, 125.
- [14] M. Moreno-Guzmán, M. Eguílaz, S. Campuzano, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Analyst* **2010**, *135*, 1926.
- [15] M. Moreno-Guzmán, I. Ojeda, R. Villalonga, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, in press.
- [16] J. A. Ho, W. A. Hsu, W. C. Liao, J. K. Chiu, M. L. Chen, H. C. Chang, C. C. Li, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 1021.
- [17] P. Tijssen, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 15 (Eds: R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg), Elsevier, Amsterdam **1985**, p. 414.
- [18] G. Coneely, M. Aherne, H. Lu, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 153.
- [19] J. A. Talbot, J. W. Kane, A. White, *Ann. Clin. Biochem.* **2003**, *40*, 453.
- [20] M. Vogeser, D. Engelhardt, K. Jacob, *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1998.
- [21] S. Dobson, A. White, M. Hoadley, T. Lovgren, J. Ratcliffe, *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 1747.
- [22] L. Anfossi, C. Tozzi, C. Giovannoli, C. Baggiani, G. Giraudi, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *468*, 315.

9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ab: anticuerpo
ABA: ácido 4-aminobenzoico
ACTH: adrenocorticotropina
Ag: antígeno
AP: fosfatasa alcalina
APBA: ácido 3-aminofenilborónico
Apdo: Apartado
AuNPs: nanopartículas de oro
B&W: Binding and washing
BMIMPF₆: hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazolio
BSA: albúmina de suero bovino
%CR: reactividad cruzada
CRH: corticotropina
DES: dietilestilbestrol
DHEA: deshidroepiandrosterona
DPV: voltamperometría diferencial de impulsos
dual SPCEs: electrodos serigrafiados duales de carbono
EC₅₀: equivale a la concentración que da lugar al 50 % de inhibición respecto del valor máximo.
EDC: N-etil-N-dimetilaminopropil-carbodiimida
EG: etilenglicol
EIS: espectroscopía de impedancia electroquímica
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GABA: ácido gamma-aminobutírico
GC: cromatografía de gases
hCG: hormona gonadotropina coriónica humana
hGH: hormona del crecimiento humana
HRP: peroxidasa
17 β -HSD: enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 α -HSD: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
HSDs: hidroxesteroide deshidrogenasas

igG: inmunoglobulina G

IL: líquido iónico

Incub.: incubación

IOC: Comité Olímpico Internacional

IRMS: espectrometría de masas de relación isotópica

LC: cromatografía de líquidos

LOD: límite de detección

MBs: micropartículas magnéticas

mIU: miliunidades internacionales

MS: espectrometría de masas

MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple

n: número de medidas

NHS: N-hidroxisuccinimida

1-NP: 1-naftol

1-NPP: 1-naftilfosfato

OPPF₆: hexafluorofosfato de n-octilpiridinio

POMC: pro-opiomelanocortina

PRL: prolactina

Protein A-MBs: micropartículas magnéticas funcionalizadas con proteína A

R_{tc}: resistencia a la transferencia de carga

RIA: radio inmunoanálisis

RSD: desviación estándar relativa

SAM: monocapa autoensamblada

s_b: desviación estándar del blanco

SPCE: electrodo serigrafiado de carbono

SPE: extracción en fase sólida

SPEs: electrodos serigrafiados

SPME: microextracción en fase sólida

Strept-MBs: micropartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina

SWV: voltamperometría de onda cuadrada

teflón: politetrafluoroetileno

TMB: clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano HCl

Trizma: Tris (hidroximetil) aminometano

WADA: World Anti-Doping Agency

